

Université de Montréal

**Impact de l'hyperglycémie et de l'infection sur le transport ionique, la réparation épithéliale et l'action des correcteurs dans les voies aériennes en Fibrose kystique**

par  
Claudia Bilodeau

Département de Médecine  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences  
en Sciences Biomédicales

Juillet, 2015

© Claudia Bilodeau, 2015

## Résumé

La Fibrose kystique (FK), causée par des mutations du canal  $\text{Cl}^-$  CFTR, entraîne une dysfonction de la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  et un déséquilibre dans la sécrétion des fluides. La diminution de la clairance mucociliaire qui s'en suit occasionne une accumulation du mucus. Cet environnement est alors favorable à l'installation d'infections et d'inflammation chroniques, responsables de lésions au niveau de l'épithélium respiratoire. Le vieillissement de la population FK, suite à la prise en charge plus appropriée de la maladie, est accompagné par l'émergence de pathologies associées, telles que le diabète. Celui-ci, ainsi que plusieurs autres facteurs comme l'infection à *Pseudomonas aeruginosa*, contribuent au déclin progressif de la fonction pulmonaire, principale cause de mortalité et de morbidité des patients FK. Le maintien de la fonction pulmonaire est dépendant notamment du transport ionique et liquidien régulant la clairance mucociliaire ainsi que de la réparation épithéliale nécessaire à la génération d'un épithélium fonctionnel en réponse aux agressions. Nous avons donc évalué l'impact de l'hyperglycémie et des exoproduits de *P. aeruginosa* sur ces deux mécanismes.

Nos résultats ont tout d'abord montré qu'un niveau de glucose élevé diminue les courants  $\text{Cl}^-$  CFTR et potassique et altère la réparation de l'épithélium bronchique FK et non FK. Nous avons aussi observé que l'hyperglycémie limite l'impact bénéfique de la correction de CFTR sur la réparation épithéliale. Dans un second temps, nous avons évalué l'impact de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* sur le CFTR, qui tient un rôle important dans la fonctionnalité de l'épithélium des voies aériennes non-FK. Nous avons noté que l'expression du CFTR ainsi que sa fonction sont réduites par l'exposition aux produits bactériens dans les cellules non-FK. De plus, ces exoproduits compromettent la maturation du CFTR muté par les correcteurs ainsi que leur bénéfice sur la réparation de l'épithélium FK. Finalement, nous avons testé différentes combinaisons de composés correcteurs et potentiateurs de CFTR afin de déterminer quelle stratégie serait la plus efficace afin de favoriser la réparation épithéliale bronchique FK malgré la présence d'infection.

**Mots-clés :** Fibrose kystique, CFTR, correcteur, potentiateur, *Pseudomonas aeruginosa*, CFRD, diabète, réparation épithéliale, canaux ioniques

## Abstract

Cystic fibrosis (CF), caused by mutations in the *CFTR* gene, is characterized by dysfunctional  $\text{Cl}^-$  secretion and an imbalance in ion/fluid transport resulting in a decrease in mucociliary clearance. Accumulation of mucus then occurs and this favors bacterial infection in the airways. Chronic infection and inflammation is then responsible for progressive injuries to the lung epithelium. These mechanisms are associated with a decline in lung function, the main cause of morbidity and mortality in CF. The recent improvement in clinical care of patients with CF has led to an increase in median life expectancy, which allows the emergence of comorbidities, such as CF-related diabetes (CFRD). Because *Pseudomonas aeruginosa* infection and CFRD have been associated with decreased lung function, we investigated their impact on ion transports and epithelial repair, two main functions of airway epithelia.

First, our results showed a reduction in  $\text{Cl}^-$  secretion by CFTR and total  $\text{K}^+$  currents through CF and non-CF airway epithelial cells in hyperglycemic conditions. Moreover, our data indicated a decrease in wound closure rates of airway cell monolayers after exposure to high glucose. We also demonstrated an impairment of the beneficial effect of CFTR correctors on repair rates. The second part of our studies reveals a deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) on CFTR expression and function in non-CF airways cells. Importantly, we showed, for the first time, that the presence of PsaDM altered the functional rescue of mutated CFTR by correctors and dampened their beneficial effect on CF wound repair. Finally, we tested several different combinations of corrector and potentiators in order to identify the most efficient compounds to improve the repair rates of CF monolayers despite the presence of PsaDM.

Overall, our research demonstrated a deleterious impact of CFRD and PsaDM on ion transports and wound closure. Moreover, the new therapies with correctors may also be impacted by these two components.

**Keywords :** Cystic Fibrosis, CFTR, *Pseudomonas aeruginosa*, CFRD, epithelial repair, ionic transport, corrector



# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1; introduction.....	1
1.1 Pathologie de la Fibrose Kystique.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Organes touchés.....	2
1.2 CFTR .....	3
1.2.1 Gène <i>CFTR</i> .....	3
1.2.2 Structure du canal CFTR.....	4
1.2.3 Régulation du canal .....	5
1.2.4 Maturation du canal et localisation à la membrane plasmique .....	6
1.2.5 Classes de mutations .....	7
1.2.5.1 Classe I .....	7
1.2.5.2 Classe II.....	8
1.2.5.3 Classe III.....	8
1.2.5.4 Classe IV .....	8
1.2.5.5 Classe V .....	9
1.2.5.6 Classe VI .....	9
1.3 Rôles du CFTR au niveau pulmonaire.....	10
1.3.1 Expression et localisation du CFTR dans le poumon .....	10
1.3.2 Fonction du CFTR-WT dans les voies aériennes conductrices.....	12
1.3.3 Clairance mucociliaire .....	12
1.3.3.1 Condition non pathologique .....	12

1.3.3.2 Condition pathologique de la FK .....	14
1.3.4 Relation entre la clairance mucociliaire et l'infection en FK.....	15
1.3.5 Microenvironnement de l'épithélium pulmonaire en FK .....	15
1.4 Infections pulmonaires en FK .....	16
1.4.1 Généralités.....	16
1.4.1.1 <i>S. Aureus</i> .....	17
1.4.1.2 <i>Complexe Burkholderia cepacia (BCC)</i> .....	17
1.4.1.3 <i>Stenotrophomonas Maltophilia</i> .....	18
1.4.1.4 <i>P. aeruginosa</i> .....	18
1.4.2 Foyers d'infection et interactions entre les pathogènes .....	19
1.4.2 Mécanismes d'interactions entre l'épithélium et <i>P. aeruginosa</i> .....	20
1.4.3 Impact de l'infection et l'inflammation sur le CFTR .....	21
1.4.3.1 Impact de <i>P. aeruginosa</i> sur le canal CFTR.....	21
1.4.3.2 Impact de l'inflammation sur le canal CFTR .....	22
1.4.4 Impact lésionnel.....	23
1.4.4.1 Infection.....	23
1.4.4.2 Inflammation.....	24
1.5 Réparation épithéliale bronchique .....	25
1.5.1 Mécanismes impliqués en réparation.....	25
1.5.2 Implication du canal CFTR en réparation.....	27
1.5.3 Réparation en FK.....	28
1.5.4 Impact de l'infection sur la réparation .....	28
1.6 CFRD .....	29
1.6.1 Description du CFRD .....	29
1.6.2 Impact pulmonaire du CFRD .....	31
1.6.3 Impact du CFRD sur la réparation épithéliale et le transport ionique .....	32
1.7 Thérapies.....	33
1.7.1 ASL et mucus .....	34
1.7.2 Traitement de l'infection.....	34
1.7.3 Traitement de l'inflammation.....	36
1.7.3.1 Corticostéroïdes .....	36

1.7.3.2 Ibuprofène.....	37
1.7.3.3 Antioxydant .....	37
1.7.3.4 Autres agents agissant sur l'inflammation .....	37
1.7.4 Thérapie génique .....	38
1.7.5 Transplantation .....	38
1.7.6 Thérapies visant d'autres canaux.....	39
1.7.6.1 ENaC .....	40
1.7.6.2 CaCC .....	40
1.7.6.3 Canaux K <sup>+</sup> .....	40
1.7.7 Thérapies ciblées par classe de mutations du CFTR .....	40
1.7.7.1 Classe I .....	41
1.7.7.2 Classe II .....	41
1.7.7.3 Classe III.....	41
1.7.7.4 Classe IV .....	43
1.7.7.5 Classe V .....	43
1.7.7.6 Classe VI .....	43
1.8 Thérapie pour la classe II .....	43
1.8.1 Correcteurs .....	44
1.8.1.1 Mécanismes d'action.....	45
1.8.1.2 Correcteur VRT-325 .....	47
1.8.1.3 Correcteur VX-809 (Lumacaftor).....	47
1.8.2 Combinaisons de correcteurs et potentiateurs .....	48
Chapitre 2; Hypothèses et Objectifs.....	51
2.1 Préambule .....	51
2.2 Hyperglycémie .....	52
2.2.1 Hypothèse.....	52
2.2.2 Objectifs .....	53
2.2.2.1 Impact de l'hyperglycémie sur le transport ionique.....	53
2.2.2.2 Impact de l'hyperglycémie sur la réparation épithéliale bronchique .....	53

2.2.2.3 Impact de l'hyperglycémie sur l'effet bénéfique de la correction de CFTR sur la réparation épithéliale bronchique FK .....	53
2.3 Infection et CFTR.....	53
2.3.1 Hypothèse.....	53
2.3.2 Objectifs .....	54
2.3.2.1 Effet de PsaDM sur le CFTR-WT et F508del .....	54
2.3.2.2 Mécanisme régulant la diminution de l'expression protéique du CFTR .....	54
2.3.2.3 Impact du PsaDM sur la correction.....	54
Chapitre 3; Résultats publiés et contribution aux articles .....	55
3.1 Article 1: Deleterious impact of hyperglycemia on Cystic Fibrosis airway ion transport and epithelial repair .....	55
3.1.1 Résumé.....	55
3.1.2 Contribution.....	55
3.2 Article 2 : Deleterious impact of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and rescue in airway epithelial cells. ....	81
3.2.1 Résumé.....	81
3.2.2 Contribution.....	81
Chapitre 4; Discussion.....	117
4.1 Impact de l'hyperglycémie et de l'infection sur le transport ionique.....	117
4.1.1 CFRD .....	117
4.1.1.1 Canaux $\text{Cl}^-$ .....	117
4.1.1.2 Canaux $\text{K}^+$ .....	118
4.1.2 Infection à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	119
4.1.2.1 CFTR.....	119
4.1.2.2 Canaux $\text{K}^+$ .....	120
4.2 Réparation .....	121
4.2.1 Impact du CFRD sur les processus de réparation.....	121
4.2.2 Impact de l'infection à <i>P. aeruginosa</i> sur la réparation épithéliale .....	122
4.3 Efficacité des correcteurs en conditions hyperglycémiques ou infectieuses .....	124
4.3.1 Correcteur et CFRD .....	124

4.3.2 Correcteurs et infection .....	125
4.4 Stratégie permettant l'amélioration de la réparation en présence de PsaDM .....	126
4.4.1 Combinaison de correcteur et de potentiateur .....	126
4.4.2 Combinaison de correcteurs .....	130
4.4.3 Combinaison de correcteurs, potentiateur et activateurs des canaux $K^+$ .....	131
4.5 Limitations expérimentales .....	133
4.5.1 Modèle d'hyperglycémie .....	133
4.5.2 Modèles cellulaires utilisés .....	134
4.5.3 Modèle de plaies mécaniques .....	136
4.5.4 Modèle d'infection .....	137
4.5.5 Molécules correctrices et potentiatrice utilisées .....	139
4.6 Perspectives .....	139
Chapitre 5; Conclusion .....	142
Bibliographie .....	143
Article 1 .....	i
Article 2 .....	ii

## Liste des figures

<b>FIGURE 1.</b> Âge médian prédit de survie des patients Fibrose kystique de 1974 à 2013 .....	2
<b>FIGURE 2.</b> Modélisation du canal CFTR. ....	5
<b>FIGURE 3.</b> Schéma d'interactions des différents domaines suivant la phosphorylation du domaine R du canal CFTR-WT. ....	6
<b>FIGURE 4.</b> Classes de mutations du <i>CFTR</i> ... ..	10
<b>FIGURE 5.</b> Expression du CFTR dans les cellules épithéliales humaines bronchiques différenciées. ....	11
<b>FIGURE 6.</b> Schématisation des canaux ioniques impliqués dans le maintien du liquide de surface des voies aériennes (ASL). ....	14
<b>FIGURE 7.</b> Schéma de la pathophysiologie pulmonaire de la FK. ....	15
<b>FIGURE 8.</b> Prévalence des microorganismes présents dans les voies aériennes des patients FK en 2013.. ....	17
<b>FIGURE 9.</b> Mécanismes impliqués dans la réparation épithéliale. ....	27
<b>FIGURE 10.</b> Détérioration de l'état clinique des patients FK associée à l'apparition des anomalies liées au glucose. ....	32
<b>FIGURE 11.</b> Aperçu des antibiotiques développés depuis 1920 et des antibiotiques oraux utilisés en prophylaxie pour différentes tranches d'âge en 2013. ....	36
<b>FIGURE 12.</b> Thérapies ciblant des canaux alternatifs au CFTR. ....	39
<b>FIGURE 13.</b> Thérapies envisagées pour chacune des classes de mutations. ....	41
<b>FIGURE 14.</b> Structure de la molécule potentiatrice Vx-770. ....	42
<b>FIGURE 15.</b> Comparaison entre le NBD1 du CFTR-F508del et du CFTR-WT et de leur synthèse. ....	44
<b>FIGURE 16.</b> Classes de correcteurs et leur action sur le CFTR muté. ....	45
<b>FIGURE 17.</b> Structure de la molécule correctrice VRT-325. ....	47
<b>FIGURE 18.</b> Structure de la molécule correctrice Vx-809. ....	48

<b>FIGURE 19.</b> Données préliminaires montrant l'expression du canal KvLQT1 suite à l'exposition au PsaDM. ....	120
<b>FIGURE 20.</b> Diminution de la vitesse de réparation des cellules primaires des voies aériennes FK suite à l'exposition au PsaDM.. ....	123
<b>FIGURE 21.</b> Diminution de l'effet bénéfique du VRT-325 sur la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK en présence de PsaDM.....	126
<b>FIGURE 22.</b> Augmentation de la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK lors d'un traitement combiné d'un correcteur et d'un potentiateur.....	127
<b>FIGURE 23.</b> Augmentation de la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK lors d'un traitement combiné d'un correcteur et d'un potentiateur en présence et en absence de PsaDM.....	129
<b>FIGURE 24.</b> Impact d'un traitement combiné avec le VRT-325, le Vx-809 et le Vx-770 sur la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK en présence et en absence de PsaDM. ....	130
<b>FIGURE 25.</b> Impact de la modulation du KvLQT1 en absence et en présence de PsaDM. ....	131
<b>FIGURE 26.</b> Impact de la correction/potentialisation du CFTR en combinaison avec des activateurs des canaux $K^+$ sur la réparation épithéliale des cellules humaines primaires des voies aériennes, en présence de PsaDM. ....	132

## Liste des abréviations

ABC : Cassette liant l'ATP (*ATP binding cassette*)

Abnl CGM : Surveillance en continu du glucose à domicile anormale (*Abnormal home continuous glucose monitoring*)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANO1 : *Anoctamin-1*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASL : Liquide de surface des voies aériennes (*Airway surface liquid*)

ATP : Adénosine triphosphate

BALF : Lavage broncho-alvéolaire (*Bronchoalveolar lavage fluid*)

BCC : *Complexe burkholderia cepacia* (*Burkholderia cepacia complex*)

BKCa : Canaux potassiques activés par le calcium

CaCC : Canaux chlore activés par le calcium (*Calcium-activated chloride channel*)

CFF: Fondation de la Fibrose Kystique (*Cystic Fibrosis Foundation*)

CFRD: Diabète relié à la Fibrose Kystique (*Cystic Fibrosis-related diabetes*)

CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CFTR-WT: CFTR sauvage (*wild type Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator channel*)

CGM: Surveillance du glucose en continu (*Continuous glucose monitoring*)

Cif : Facteur inhibiteur du CFTR (*CFTR inhibitory factor*)

Cl<sup>-</sup> : Ion chlore

COX 1 : Cyclooxygénase 1

CRP : Protéines réactives C (*C reactive protein*)

CuFi : Lignée de cellules FK des poumons provenant de l'Université de l'Iowa

ECM : Matrice extracellulaire (*Extracellular matrix*)

EGF : Facteur de croissance épidermique (*Epidermal growth factor*)

ENaC : Canal sodique épithélial (*Epithelial sodium channel*)



ERAD: Système de dégradation associé au réticulum endoplasmique (*Endoplasmic reticulum associated degradation*)

F508del : délétion d'une phénylalanine à la position 508

FDA: *Food and drug administration*

FEV<sub>1</sub>: Volume expiratoire maximal en une seconde (*Force expiratory volume in one second*)

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes (*Fibroblast growth factor*)

FH- : Sans hyperglycémie à jeun (*Without fasting hyperglycemia*)

FH+ : Avec hyperglycémie à jeun (*With fasting hyperglycemia*)

FK : Fibrose Kystique

G551D : La glycine en position 551 est remplacée par l'acide aspartique

GTPase: Hydrolyseur de guanosine triphosphate

*H. influenza*: *Haemophilus influenza*

HBE: Cellules épithéliales humaines bronchiques (*Human bronchial epithelial cells*)

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> : Ions bicarbonate

hERG : *human ether-à-go-go related gene*

ICS: Corticostéroïde inhalé (*Inhaled corticosteroid*)

IGT : Tolérance au glucose altérée (*Impaired glucose tolerance*)

IL-1β : Interleukine 1-béta

IL-8 : Interleukine 8

INDET : Glycémie indéterminée (*Indetermined glycemia*)

IP : Insuffisance pancréatique

ISHLT: Société internationale de transplantation cardiaque et pulmonaire (*International society heart lung transplant*)

K<sup>+</sup> : Ion potassique

Kv : Canaux potassiques voltage-dépendants

LPS : Lipopolysaccharides

MAPK P38 : Protéine kinase activée par les mitogènes (*Mitogen-activated protein kinases*)

HGF : Facteur de croissance hépatocytaire (*Hepatocyte growth factor*)

MMP : Métalloprotéinase de la matrice (*Matrix metalloproteinase*)

MPO : Myeloperoxydase

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique

MSD : Domaine transmembranaire (*membrane-spanning domain*)

Na<sup>+</sup> : Ion sodique

NBD : Domaine liant les nucléotides (*nucleotide binding domain*)

NHERF1 : *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory cofactor 1*

NKCC : Cotransporteur du Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et 2 Cl<sup>-</sup>

NuLi : Lignée de cellules non FK des poumons provenant de l'Université de l'Iowa

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

PCL : Liquide périciliaire (*Periciliary liquid*)

PDE4: Phosphodiesterase cyclique 4 (*phosphodiesterase 4*)

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PsaDM : Produits diffusibles de *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa diffusible material*)

P-Stat-1: *phosphorylated signal transducer and activator of transcription-1*

QS: *Quorum sensing*

R : Domaine régulateur

RE: Réticulum endoplasmique (*Endoplasmic reticulum*)

Rho GTPases : Hydroliseur de la guanosine triphosphate de la famille Rho

*S. Aureus*: *Staphylococcus aureus*

SiRNA : Petits ARN interférents (*Small interfering RNA*)

*S. Maltophilia*: *Stenotrophomonas Maltophilia*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline

TIMP-1 : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*)

TLR : Récepteur de type *Tolls* (*Tolls like receptor*)

TM : Segment transmembranaire (*Transmembrane*)

UPS : Système d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome (*Ubiquitin proteasome system*)

WT : Sauvage (*Wild type*)

# Remerciements

Je voudrais premièrement remercier les membres du jury, Dre. Maillot et Dre. Coderre d'avoir accepté de corriger mon mémoire.

Deuxièmement, je voudrais remercier Dre. Emmanuelle Brochiero qui m'a ouvert les portes de son laboratoire alors que je n'avais que 18 ans. Je vous remercie grandement de l'avoir fait et de m'avoir donné cette chance. Dre. Brochiero vous êtes une femme de courage et je vous admire beaucoup. C'est en grande partie grâce à vous que j'ai réalisé tous ces projets, ma maîtrise et qui m'avez motivé à poursuivre vers les études doctorales. Merci pour votre temps et d'avoir partagé votre savoir avec moi. Anik, Émilie et Thu Ngan, vous êtes là depuis le début et vous avez rempli toutes ces années de joies et de fou rire. Vous faites partie des raisons pour laquelle j'ai choisi cette carrière. Anik et Émilie, votre support et votre temps sont essentiels à la réussite du laboratoire, on ne vous le dit jamais assez, mais merci mille fois! Gardez cette belle passion et cette folie qui rendent chaque jour un peu plus facile! Vous allez me manquer...Je voudrais aussi remercier tous les membres du labo que j'ai connu au fil des ans. Alban et Manon votre soutien et expertise ainsi que vos réflexions m'ont permis de grandir et d'améliorer mes connaissances. J'ai apprécié travailler avec vous et vous souhaite la meilleure des chances pour la poursuite de votre carrière. Damien, un merci tout spécial pour le temps que tu as pris pour partager tes connaissances et tes conseils pour l'écriture de mon mémoire. Tu es un chercheur dans l'âme et un passionné! Jasmine, surement la plus drôle du labo et évidemment que tes blagues me manqueront! Ton support et tes encouragements ont été d'une grande aide. Je te souhaite de t'amuser et de profiter des moments que tu passes au labo et je suis très heureuse de te compter dans mon cercle d'ami. Prends bien soin d'Aniko et d'Émilio!

De plus, je remercie ma famille et particulièrement mes parents de leur soutien et leurs encouragements. Je vous aime et vous êtes certainement les meilleurs parents!

Finalement, je te remercie toi l'homme de ma vie pour ton soutien chaque jour depuis le moment où j'ai quitté mon petit village pour cette grande ville. Merci pour ta patience, ton temps, tes encouragements et pour ta présence. Tous ces soirs, fin de semaines où j'ai travaillé, où tu m'as soutenue et tu t'es impliqué m'ont permis d'accomplir ces projets! Il y a

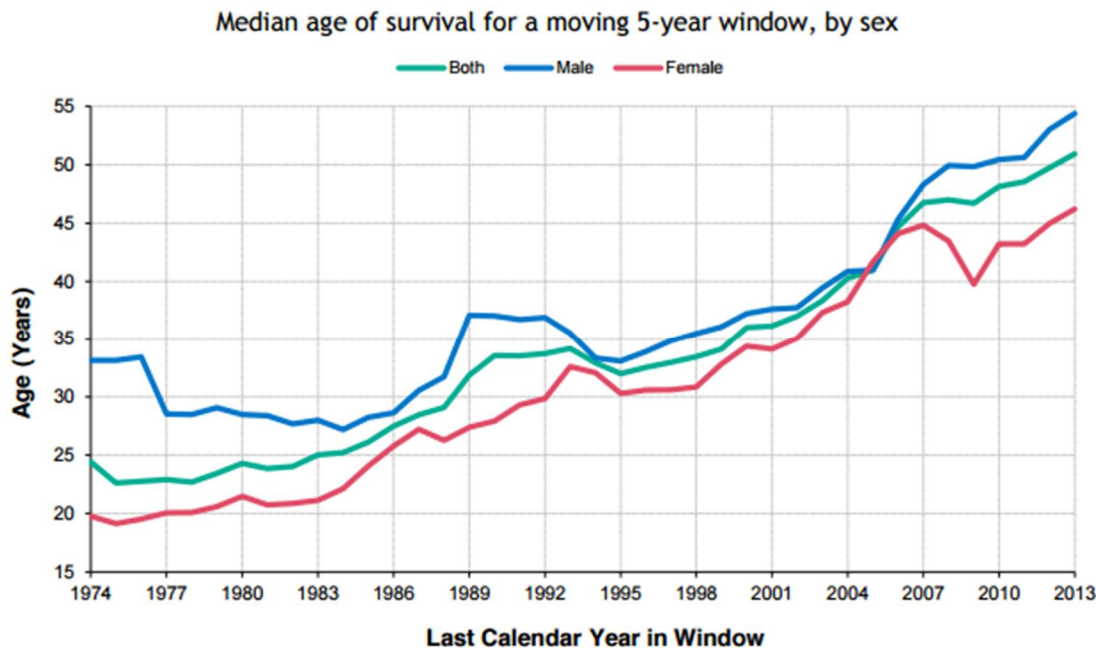
certainement beaucoup de toi dans ce mémoire. Et maintenant, nous sommes prêts pour une nouvelle aventure ensemble! Je t'aime!

# Chapitre 1; introduction

## 1.1 Pathologie de la Fibrose Kystique

### 1.1.1 Généralités

La Fibrose kystique (FK) est la maladie génétique la plus commune chez les Caucasiens. En effet, dans cette population, l'incidence de la FK est d'un nouveau-né sur 2500 tandis qu'elle est plutôt rare - une naissance sur plus de 100 000 - chez les Asiatiques (1). Au Canada, un enfant sur 3 600 naît avec la FK (<http://www.cysticfibrosis.ca/fr/about-cf/what-is-cystic-fibrosis/?lang=fr>). La *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) estime qu'environ 70 000 personnes dans le monde entier en sont affectées (<http://www.cff.org/AboutCF/>). Au Canada, le rapport annuel de *Cystic Fibrosis Canada* recense environ 4 000 patients. Cette pathologie était associée au décès des patients en bas âge jusqu'à récemment. Toutefois, au cours des dernières années, l'espérance de vie des patients a considérablement augmenté : elle est passée de 4 ans en 1957 à 39 ans en 2012. A l'heure actuelle, au Canada, environ 60% de la population FK est adulte et il est estimé que les enfants FK nés dans cette décennie atteindront 50 ans (1).



**FIGURE 1. Âge médian prédit de survie des patients Fibrose kystique de 1974 à 2013.** (Les hommes en bleu, les femmes en rouge et les deux sexes moyennés en vert). *Tirée du rapport annuel 2013 de la Fondation Canadienne de la Fibrose Kystique.*

Cette impressionnante amélioration de la survie des patients FK, en un cours laps de temps, a été possible entre autre grâce à une prise en charge des patients plus adéquate, suite au diagnostic précoce (dans certains pays le dépistage se fait à la naissance) ainsi qu'au meilleur traitement des fréquentes infections (1-3).

### 1.1.2 Organes touchés

La FK est une maladie génétique autosomale récessive causée par des mutations dans le gène codant pour le canal chlore (Cl<sup>-</sup>) *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (4-7). Plus de 1 900 mutations du gène *CFTR* ont été identifiées à ce jour (1) (<http://www.genet.sickkids.on.ca/>). La FK a d'abord été décrite comme une obstruction de divers canaux par du mucus épais, ce qui lui vaut le nom de mucoviscidose en France (8). Le CFTR est exprimé dans plusieurs types de cellules épithéliales et sécrétrices: sudoripares, pancréatiques, des voies aériennes, de la vésicule biliaire... Cette pathologie affecte donc plusieurs systèmes dont les systèmes respiratoire, reproducteur et digestif (9). En fait, la

majorité des hommes FK (plus de 95%) sont infertiles suite à l'obstruction ou à l'absence du canal déférent. Une fertilité réduite est aussi observée chez certaines patientes FK et pourrait être causée par une altération du mucus cervical (10). Le pancréas exocrine est aussi affecté par la dysfonction du CFTR qui provoque un épaissement du mucus et l'obstruction des canaux pancréatiques (11). Celle-ci limite donc le passage des enzymes pancréatiques et ainsi prévient la digestion de certains aliments, comme les lipides. La majorité des patients FK (85%) souffrent d'insuffisance pancréatique (IP) et cette atteinte est liée aux génotypes les plus sévères (1). La prise d'enzymes de remplacement est donc nécessaire pour ces patients. Des obstructions intestinales, une diminution de la densité minérale des os ainsi que des maladies du foie sévères comme la cirrhose sont aussi fréquentes et font partie des manifestations cliniques de cette pathologie (11). Cependant, la plus grande cause de mortalité est la défaillance respiratoire des patients FK causée notamment par l'accumulation de mucus au niveau des voies aériennes et des cycles d'infections et d'inflammation chronique (9, 10). Le volume expiratoire maximal en une seconde ( $FEV_1$ ) est utilisée afin d'évaluer la fonction pulmonaire des patients. Son déclin est associé à plusieurs facteurs dont la nutrition, l'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et le diabète relié à la FK (CFRD : *Cystic Fibrosis Related Diabetes*). Ces trois facteurs sont fréquemment évalués auprès des patients FK et permettent de déterminer l'évolution de la maladie chez ces patients (12).

## 1.2 CFTR

### 1.2.1 Gène *CFTR*

Bien que la FK soit reconnue comme une maladie à part entière depuis 1938 (9), ce n'est qu'en 1989 que le gène *CFTR* a été identifié et cloné (5-7). Cette découverte a permis un fort avancement des connaissances dans le domaine. Le gène *CFTR* est d'une longueur d'environ 250 kb composé de 27 exons et il est situé sur le long bras du chromosome 7 (7q31.2) (13). Il permet en condition non pathologique la production d'une protéine de 1 480 acides aminés : le CFTR (9), dont la fonction principale est d'être un canal ionique perméable au  $Cl^-$  (14, 15).

### 1.2.2 Structure du canal CFTR

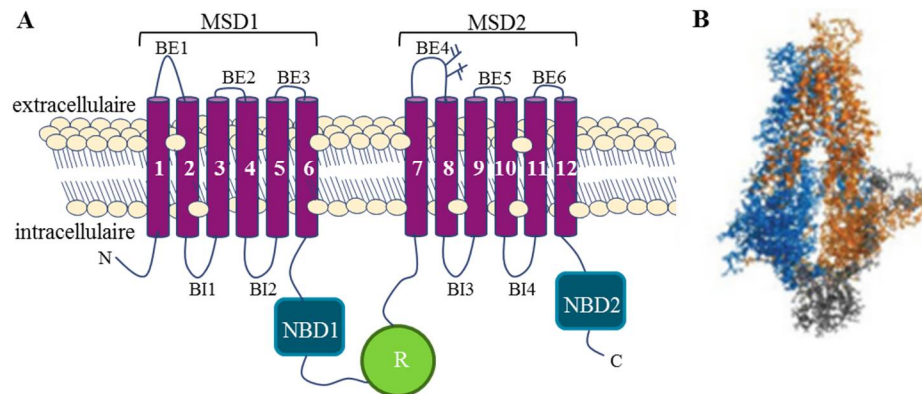
Le CFTR a été purifié pour la première fois en 1991 par l'équipe du Dr. Riordan (16). Préalablement, l'équipe du Dr. Tsui et du Dr. Riordan (5) avait proposé une structure possible en 2 dimensions de la protéine qui semble toujours valide, bien qu'aucune identification/image directe de la protéine entière en 3 dimensions à haute résolution ne soit disponible à ce jour (17).

La protéine CFTR est classée dans la famille des transporteurs ABC qui ont une cassette liant l'adénosine triphosphate (ATP) puisque deux domaines de liaison au nucléotide (NBD, liant l'ATP) entrent dans sa composition (5, 18). Par contre, le canal CFTR semble être la seule exception connue de la famille, puisqu'il agit comme un canal et qu'il permet la diffusion du  $\text{Cl}^-$ , des ions bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  ainsi que d'autres petits anions (17).

Le CFTR est composé de deux domaines transmembranaires (MSD) qui comprennent chacun 6 segments transmembranaires (hélice  $\alpha$ , TM). Un NBD cytoplasmique suit chacun des MSD et ces deux complexes formés d'un MSD et d'un NBD sont reliés par un domaine régulateur (R). Celui-ci contient plusieurs sites de phosphorylations par les protéines kinase A et C (PKA, PKC) permettant sa régulation en condition physiologique (5, 19-22).

Une représentation cristallographique en deux dimensions et une structure en trois dimensions à basse résolution du CFTR permettent d'un peu mieux comprendre sa structure (22, 23).



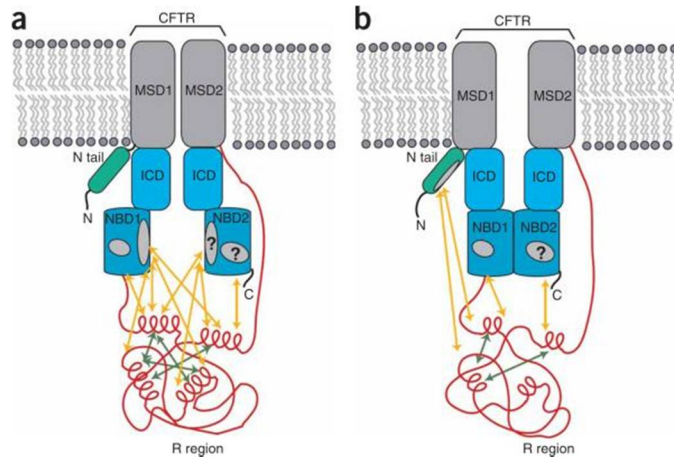


**FIGURE 2. Modélisation du canal CFTR.** A) 12 passages transmembranaires reliés par des boucles extracellulaires (BE) et intracellulaires (BI) réparties en deux domaines membranaires (MSD). Deux domaines liant les nucléotides (NBD) et un domaine régulateur (R). B) *Modélisation selon Linsdel, 2014.*

### 1.2.3 Régulation du canal

La régulation du canal CFTR est complexe et comprend l'interaction de plusieurs éléments nécessaires, qui seuls ne permettent pas l'ouverture du canal. Les mécanismes impliqués ne sont pas tous élucidés (17). Toutefois, des modèles d'ouverture et fermeture du canal ont été proposés en s'appuyant sur les résultats scientifiques publiés.

Une étape importante pour permettre l'ouverture du canal passe par la phosphorylation du domaine R par la PKA entraînant le changement des interactions entre le domaine R et les NBD qui vont se rapprocher pour former à leur interface deux sites de liaison de l'ATP, l'un étant considéré comme stable (liaison sans hydrolyse) et l'autre instable (liaison et hydrolyse d'ATP). Suivant la phosphorylation du domaine R et la liaison/hydrolyse d'ATP aux NBD, des changements conformationnels, médiés par les boucles intracellulaires, sont transmis aux segments transmembranaires, permettant ainsi l'ouverture du canal (19, 22, 24).



**FIGURE 3. Schéma d'interactions des différents domaines suivant la phosphorylation du domaine R du canal CFTR-WT.** A) Interactions qui sont favorisées lorsque le domaine R n'est pas phosphorylé et B) lorsqu'il est phosphorylé. Après la phosphorylation le domaine présente moins de structure hélicoïdale et forme moins d'interaction avec le NBD1 et probablement le NBD2, ce qui mène à l'ouverture du canal. N-terminal (N tail), domaines intracellulaires (ICD) Tirée de Baker et al, 2007.

#### 1.2.4 Maturation du canal et localisation à la membrane plasmique

La synthèse, la maturation et le repliement de la protéine CFTR sont soumis à un contrôle de qualité très strict dans la cellule. Comparativement aux autres protéines de la famille des transporteurs ABC, l'efficacité de la machinerie cellulaire à fabriquer une protéine CFTR sauvage (CFTR-WT) conforme, permettant de l'exporter du réticulum endoplasmique (RE) à la membrane plasmique, est faible (22, 25). Le CFTR mal replié est reconnu par le système de dégradation associé au RE (ERAD) qui lui utilise un système d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome (UPS). Le système UPS permet le contrôle de la qualité à au moins deux moments pendant la maturation du polypeptide CFTR : une fois à la membrane du RE et une autre à l'intérieur du cytoplasme. De plus, pendant la maturation/repliement de la protéine dans le RE, plusieurs chaperonnes sont impliquées dans la coordination du processus de maturation et de translocation dans le RE et dans le transfert du CFTR à l'appareil de Golgi. Dans le Golgi s'opère ensuite le processus de maturation du CFTR incluant la conversion des régions enrichies en mannose en des chaînes d'oligosaccharides complexes et matures sur les résidus asparagines du MSD2. C'est donc de cet appareil de Golgi que le CFTR mature est transporté par des vésicules recouvertes de clathrines jusqu'à la membrane plasmique. Son *turn-over* (ou renouvellement) est de 10% par minute et sa demi-vie est de 12-

24h. Son internalisation est probablement médiée par des endosomes recouverts de clathrines (25).

De plus, l'assemblage du canal et du pore dans la membrane plasmique est très complexe et dépend d'interactions entre les différents MSD, les NBD et le domaine régulateur qui permettent de stabiliser la protéine (21, 22).

### **1.2.5 Classes de mutations**

Les mutations dans le gène *CFTR* en FK, ont été organisées en différentes classes (de I à VI) en fonction de leur répercussions sur la synthèse, la structure et la fonction de la protéine (1, 13). Comme la FK est une maladie autosomale récessive, un patient aura deux mutations (une sur chaque allèle), qui peuvent appartenir à deux classes différentes. Le génotype (sévérité des mutations) est fortement associé à l'insuffisance pancréatique, aux anomalies liées au foie et à l'intestin. En effet, le phénotype pancréatique des patients portant deux mutations affectant gravement le transport de  $\text{Cl}^-$  par le CFTR (classe I à III ou VI) est plutôt sévère (insuffisance pancréatique) tandis que les patients ayant une mutation de classe IV et V ont un phénotype moins sévère (suffisance pancréatique) (1, 25). Par contre, le génotype ne prédit pas le déclin de la fonction pulmonaire et il est difficile de prévoir l'évolution de la maladie même chez des patients atteints de la même mutation. La gravité de la maladie semble également être associée à des gènes modificateurs ainsi qu'à l'environnement (1, 26).

#### **1.2.5.1 Classe I**

Les mutations de classe I, caractérisées par l'apparition d'un codon-stop prématuré, conduisent à la production d'une protéine tronquée (1, 10, 13, 25, 27). Cette classe inclut les phénotypes les plus sévères puisqu'aucune protéine CFTR n'est présente à la membrane. Les protéines incomplètes produites sont ainsi reconnues par des chaperonnes à l'intérieur du RE et sont rapidement dégradées par le système du protéasome (10, 25). Les mutations les plus communes de cette classe sont G542X, R1162X, R553X, W1282X et 621+1G→T (1, 10, 13, 25). Les mutations de classe I sont particulièrement présentes dans les communautés juives de l'Europe occidentale (11) et affecteraient 10% des patients FK toutes nationalités confondues (25).

### **1.2.5.2 Classe II**

Les mutations de cette catégorie engendrent la production de protéines immatures, mal repliées. Ainsi, elles ne forment pas la structure tertiaire appropriée et sont partiellement glycosylées (11). Ces protéines sont alors retenues dans le RE et dégradées rapidement, en partie par le protéasome (13). En conséquence, le CFTR produit n'atteint pas la membrane plasmique (1, 10, 13, 25). Plusieurs mutations entraînant une délétion ou un faux-sens se retrouvent dans cette classe : N1303K, 1507del et F508del. Cette dernière est retrouvée chez environ 70% des patients (<http://www.cff.org/AboutCF/>) (1, 10, 13, 25). Bien que cette classe de mutation affecte l'adressage de CFTR à la membrane, il a été démontré qu'une faible proportion de CFTR résiduel peut s'y trouver dans les cellules F508del (10). (La mutation F508del sera discutée plus longuement dans la section 1.8)

### **1.2.5.3 Classe III**

Dans cette classe sont rassemblées les mutations qui affectent la régulation du canal. La protéine est synthétisée, repliée et transportée normalement à la membrane plasmique, mais celle-ci est incapable de lier l'ATP/AMPc et/ou de coupler cette liaison à l'activation du canal. Les mutations de cette classe se retrouvent dans les NBD et donc ne répondent pas à l'AMPc et l'ATP (1, 10, 11, 13, 25). La mutation la plus commune de cette classe est la G551D et ces mutations de classe III affectent 2-3% des patients FK dans le monde (25).

### **1.2.5.4 Classe IV**

La classe IV regroupe les mutations qui produisent une protéine localisée à la membrane, mais avec un problème de conductance (diminution de la perméabilité au Cl<sup>-</sup> et diminution de la probabilité d'ouverture). Les mutations R117H, R334W et R347P, localisées dans les segments transmembranaires, touchent moins de 2% de la population FK. On considère que ces mutations donnent un phénotype moins sévère puisqu'il subsiste une fonction résiduelle du canal suffisante pour atténuer les manifestations cliniques FK (1, 10, 13).

#### **1.2.5.5 Classe V**

Cette catégorie est associée, tout comme la classe IV, à des phénotypes moins sévères de la pathologie, puisque ces mutations permettent la présence de CFTR à la membrane plasmique, mais en quantité plus limitée. Il est question majoritairement de problèmes au niveau de la synthèse et de l'adressage à la membrane dus à un défaut de l'épissage qui génère des transcrits parfois normaux et parfois aberrants (1, 11, 13). Moins de 2% de la communauté FK est porteuse de ce type de mutations (exemple : 3849 + 10 kb C > T, 3272-26 A > G) (1, 13).

#### **1.2.5.6 Classe VI**

Finalement, la dernière catégorie regroupe les protéines synthétisées, qui sont insérées à la membrane plasmique, mais dont la stabilité est réduite (1, 11, 13). Ces mutations sont majoritairement causées par un décalage du cadre de lecture, un codon non-sens ou un codon-stop prématuré, mais qui permettent la synthèse du CFTR. Généralement, il est question d'une troncation dans le C-terminal (11). Ces protéines sont rapidement internalisées pour être dégradées (1, 11, 13). En effet, la protéine mature mutée est dégradée de 5 à 6 fois plus rapidement que le CFTR-WT (11). Les mutations de cette classe comme la Q1412X ou la 1811 + 1,6 kb A > G entraînent en principe un phénotype sévère (11, 13).

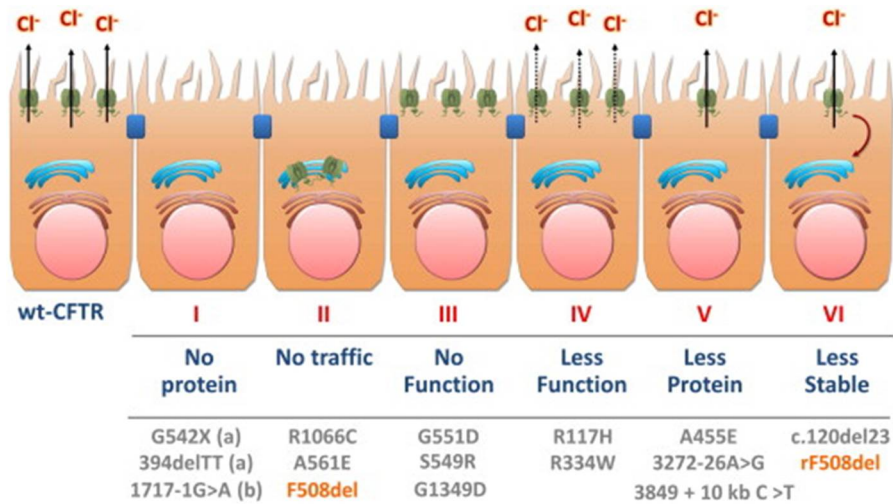
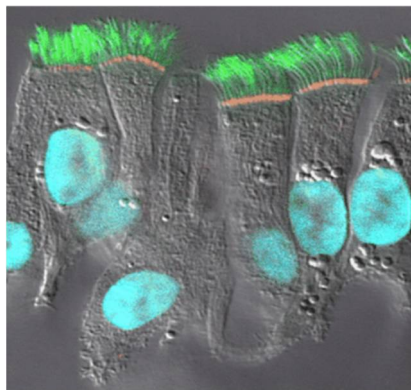


FIGURE 4. Classes de mutations du *CFTR*. Tirée de Bell et al, 2014.

## 1.3 Rôles du CFTR au niveau pulmonaire

### 1.3.1 Expression et localisation du CFTR dans le poumon

Les voies aériennes conductrices, qui comprennent le nez, la trachée et les bronches, permettent le passage de l'air vers la partie respiratoire du poumon, qui inclu les bronchioles respiratoires et les alvéoles où ont lieu les échanges gazeux (28). Au départ, la localisation préférentielle du CFTR a fait l'objet de controverses. Tout d'abord, il été montré au niveau des glandes sous-muqueuses dans les bronches (29). Plusieurs autres études ont démontré un fort courant CFTR dans les cultures épithéliales de cellules primaires humaines bronchiques différenciées qui expriment majoritairement des cellules ciliées. En effet, il a été décrit plus récemment que le CFTR semble fortement exprimé à la membrane apicale des cellules ciliées, peu exprimé dans les cellules des glandes sous-muqueuses, peu présent, voire absent dans les cellules caliciformes, et absent dans les cellules basales (30).



**FIGURE 5. Expression du CFTR dans les cellules épithéliales humaines bronchiques différenciées.** Immunomarquage de CFTR (rouge), des cils (tubuline, vert) et du noyau (bleu). Tirée de Kreda et al, 2005.

L'épithélium des voies aériennes, qui s'étend de la trachée aux bronchioles, est pseudostratifié et comprend majoritairement des cellules ciliées ayant des cils d'une longueur d'environ 6  $\mu\text{m}$ . Elles permettent principalement la clairance mucociliaire (**section 1.3.3**), mais aussi la régulation de l'hydratation du liquide de surface des voies aériennes (ASL) ainsi que de sa composition ionique par l'entremise de différents canaux. Les cellules sécrétrices en surface de l'épithélium, appelées cellules caliciformes, ainsi que les cellules sécrétrices glandulaires situées dans la sous-muqueuse bronchique synthétisent et sécrètent le mucus (31, 32). Celui-ci est composé de glycoprotéines appelées mucines, d'immunoglobulines sécrétoires de type IgA, de peptides ou protéines à activité antimicrobienne telles que la lactoperoxydase, la lactoferrine ou les défensines (31). Les cellules caliciformes se retrouvent en plus petite quantité que les cellules ciliées dans les voies aériennes bronchiques (10%), environ une pour cinq cellules ciliées. Elles disparaissent graduellement avec la diminution du diamètre des voies aériennes pour laisser place aux cellules Club (32). Les cellules Club permettent la sécrétion de collectine, une protéine du surfactant. Elles peuvent médier l'inflammation et ont un potentiel antimicrobien (31). De plus, elles peuvent aussi agir comme cellules progénitrices des cellules ciliées ou caliciformes (32). Les cellules basales (30%) sont responsables de l'apparence pseudostratifiée de l'épithélium. Elles sont attachées à la membrane basale et permettent l'attachement des cellules ciliées et sécrétrices à celle-ci. Elles participent aussi à la régulation de la réponse inflammatoire, au mouvement transépithélial des fluides et à la régulation de la réponse oxydative (32). De plus, ces cellules permettent la

régénération de la majorité des types cellulaires bronchiques. Elles sont considérées des cellules souches/progénitrices de l'épithélium (32).

Les cellules de l'épithélium des voies aériennes ont un rôle dans la défense de l'organisme par la clairance mucociliaire, mais aussi par divers mécanismes comme la production du glutathion lors d'un stimulus induit par la phagocytose de polluants. Les jonctions intercellulaires sont aussi responsables d'une partie de la défense de l'organisme en agissant à titre de barrière physique (31).

### **1.3.2 Fonction du CFTR-WT dans les voies aériennes conductrices**

La fonction primaire du CFTR est d'être un canal perméable aux ions  $\text{Cl}^-$  (14, 22). Il permet donc la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  dans les voies aériennes conductrices (33, 34). Il a aussi un rôle important dans la sécrétion d'ions bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) de par sa perméabilité à cet anion et son rôle potentiel dans la stimulation de l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (35) (22). La sécrétion de bicarbonates participe au maintien du pH de l'ASL. Le CFTR permet aussi le transport de glutathion, l'antioxydant majeur dans le poumon (36). Évidemment, l'activité de ce canal pour le transport de ces différents ions, et son rôle régulateur direct ou indirect de différents canaux, ont plusieurs fonctions importantes dans l'épithélium des voies aériennes (22). Il a donc un rôle pléiotropique qui sera plus longuement développé dans les prochaines sections.

### **1.3.3 Clairance mucociliaire**

#### **1.3.3.1 Condition non pathologique**

Un élément important permettant la régulation de la clairance mucociliaire est l'ASL, qui dépend de la quantité de sel contenue à la surface des voies aériennes. En effet, il peut rapidement s'adapter aux changements d'osmolarité (28, 37). Il comprend le liquide périciliaire (PCL) ainsi que le mucus (38). Le PCL est le liquide par lequel le volume de l'ASL est régulé et au-dessus duquel le mucus peut se déplacer grâce à la fonction des cellules ciliées.

Le volume et la composition du PCL est régulé majoritairement par un équilibre entre l'absorption de sodium ( $\text{Na}^+$ ) et la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  par les cellules épithéliales. C'est cet



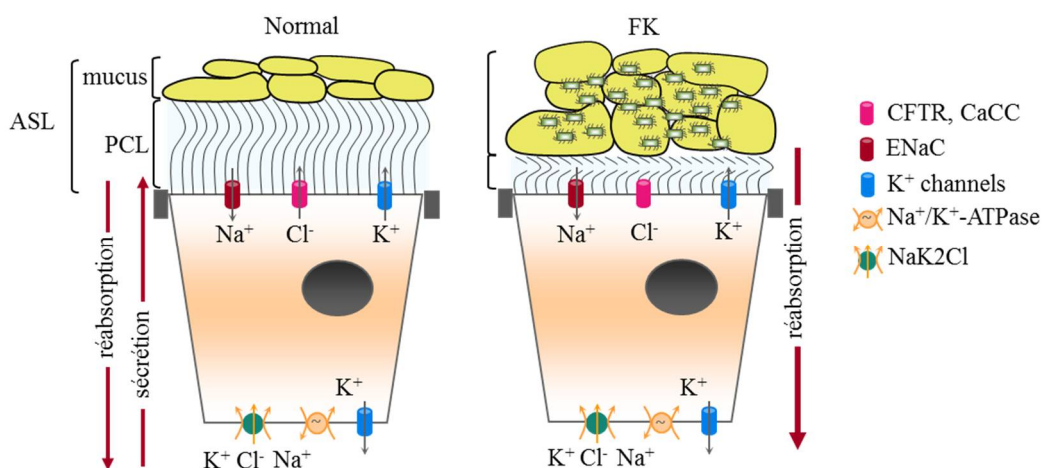
équilibre qui permet de déterminer le flux d'eau nécessaire au maintien de l'ASL (28, 38). La sécrétion de  $\text{Cl}^-$  se fait majoritairement par le canal CFTR, localisé à la membrane apicale, et l'absorption sodique, en grande partie par le canal épithélial sodique ENaC (28, 38-40). En plus du canal  $\text{Cl}^-$  CFTR apical, des canaux  $\text{Cl}^-$  activés par le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (CaCC), ont été identifiés, comme le canal ANO1. Ils participent sans doute à la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ , mais leur contribution n'est pas complètement élucidée (37, 38). Les canaux CaCC semblent activés par différents stimuli comme l'étirement et les forces de cisaillements alors que le CFTR maintient plutôt la sécrétion basale de  $\text{Cl}^-$  (28). Certaines études supportent l'idée que le canal ENaC soit régulé par le CFTR, mais cette hypothèse mérite d'autres investigations (38, 41). Finalement, les canaux potassiques ( $\text{K}^+$ ) sont aussi impliqués dans la régulation de l'ASL puisqu'ils sont essentiels dans le maintien du gradient électrochimique nécessaire à la sécrétion du  $\text{Cl}^-$  (33, 38).

Le maintien du PCL (basse viscosité et hauteur adéquate) assure un battement ciliaire efficace (hauteur de 7  $\mu\text{m}$  pour le PCL et, 6  $\mu\text{m}$  pour les cils). Le PCL prévient l'adhérence des glycoprotéines du mucus au glycocalyx de la membrane apicale des cellules épithéliales (34, 38, 40, 42). De récents travaux proposent une nouvelle hypothèse au sujet de la composition du PCL composée de mucines et de larges glycoprotéines attachées au-dessus ou au niveau des cils des cellules ciliées. Elle formerait une « sorte de filet », empêchant les grosses molécules (comme les particules inhalées) et les mucines (contenues et attrapées par la couche de mucus) d'entrer dans le PCL. Cette hypothèse offre une explication à la séparation des deux couches (mucus et PCL) qui ne se mélangent pas (42, 43).

Le mucus, qui repose sur le PCL, emprisonne les microparticules, bactéries et contaminants contenus dans l'air inspiré. Les cils des cellules ciliées, qui battent efficacement dans ces conditions, font remonter le mucus vers le pharynx afin d'éliminer ces contaminants (38, 40, 44). Cette fonction fait de la clairance mucociliaire une des premières barrières à l'infection et elle est fortement impliquée dans l'immunité innée pulmonaire (28, 34, 38-40).

Le mucus renferme des mucines (ex : MUC5AC, MUC5-B, MUC2), de l'eau, des ions et plusieurs autres substances sécrétées par les cellules (34). Ces substances permettent de combattre certains pathogènes inhalés et sont indispensables à la défense de l'organisme (38). De plus, de par sa grande composition en eau le mucus est un tampon pour le PCL puisqu'il

maintient le volume adéquat du PCL. Il permet ainsi la clairance mucociliaire pendant des variations physiologiques de l'hydratation des voies aériennes (42).



**FIGURE 6. Schématisation des canaux ioniques impliqués dans le maintien du liquide de surface des voies aériennes (ASL).** Adaptée de Bardou et al, 2009.

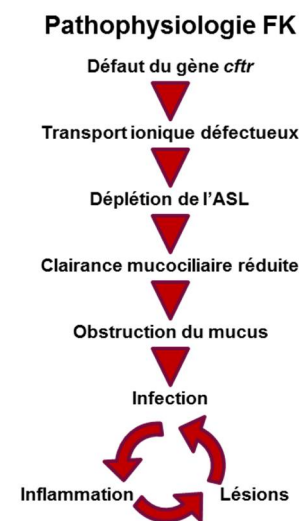
### 1.3.3.2 Condition pathologique de la FK

Dans la pathologie de la FK, le CFTR muté amène un déséquilibre au niveau de l'ASL puisque la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  par ce canal est réduite ou absente. L'activité du canal ENaC, régulant aussi le volume de l'ASL, est toujours débattue dans la FK. Il a été rapporté par certains auteurs que le canal ENaC est suractivé en absence de CFTR, entraînant une hyperabsorption et favorisant ainsi la déshydratation de l'ASL (28, 39, 41, 45). Cependant, dans d'autres études, utilisant les nouveaux modèles animaux et des cellules humaines, l'hyperabsorption par ENaC n'est pas observée (45). Le canal CFTR régule entre autres le canal ENaC. Donc il est difficile de déterminer si c'est la mutation du CFTR qui entraîne des variations au niveau de l'activité d'ENaC ou si c'est plutôt une augmentation de l'activité du canal ENaC indépendante de celle du canal CFTR qui en est la cause(41). Néanmoins, l'ensemble des études montrent que le déséquilibre entre la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  et l'absorption de  $\text{Na}^+$  affecte la clairance mucociliaire (34, 39). De plus, la déshydratation du PCL entraîne une déshydratation du mucus concentrant ainsi les mucines (39). Il s'en suit alors une accumulation du mucus, plus visqueux, épais et élastique (34, 42). Ce mucus est alors beaucoup plus difficile à déplacer et à éliminer des voies aériennes (42). Il a aussi été postulé que la réduction de la sécrétion d'ions bicarbonate chez les patients FK promeut la formation

de mucus plus collant par une interaction déficiente avec le  $\text{Ca}^{2+}$  (8) et donc réduit davantage la clairance mucociliaire.

### 1.3.4 Relation entre la clairance mucociliaire et l'infection en FK

Des évidences montrent chez les enfants FK de moins de 3 ans, une diminution du pH de l'ASL, également observée dans le modèle de cochons FK (45). Cette diminution du pH interfère avec les mécanismes de défense peptidiques de l'hôte, notamment l'activité antimicrobienne des substances sécrétées dans les voies aériennes. L'activité antimicrobienne inhibée (suite à l'inactivation des peptides et protéines de défenses), associée à une clairance mucociliaire inefficace et ralentie, empêchent l'élimination des pathogènes qui vont stagner et être le siège de zones d'infection dans les voies aériennes et respiratoires (45). De plus, l'hypersécrétion de mucus en FK (46) forme une niche favorable à l'infection par les bactéries opportunistes (34).



**FIGURE 7.** Schéma de la pathophysiologie pulmonaire de la FK. *Adaptée de Amin et al, 2014.*

### 1.3.5 Microenvironnement de l'épithélium pulmonaire en FK

Cette perturbation que subit l'environnement pulmonaire en FK affecte plusieurs composantes du système immunitaire. Par exemple, les neutrophiles ont une motilité diminuée due au mucus FK très épais. De plus, certains pathogènes comme *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) peuvent résister à la phagocytose (47). Ainsi, les propriétés

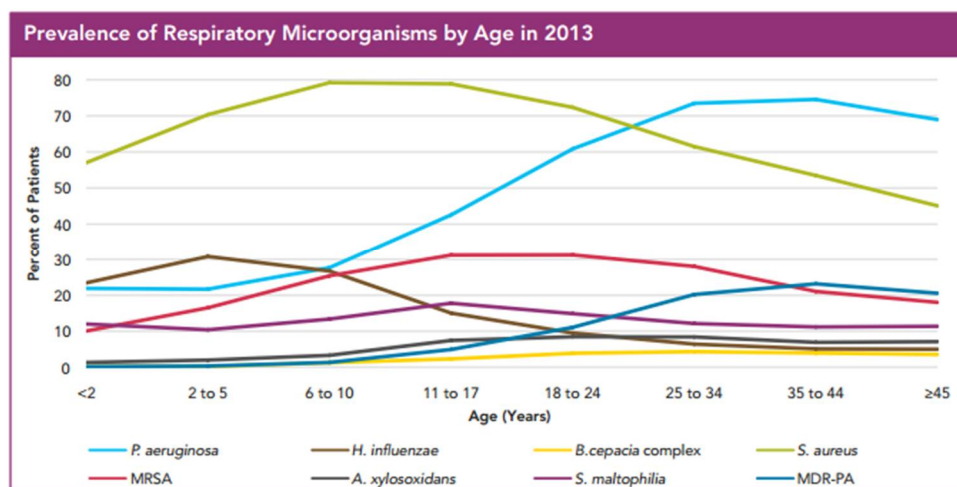
rhéologiques de l'ASL, sont importantes dans l'activité bactéricide. En effet, des changements dans la composition de l'ASL en particulier au niveau de la concentration ionique, diminuent l'activité bactéricide des macrophages, ce qui favorise la réplication bactérienne (46).

## **1.4 Infections pulmonaires en FK**

### **1.4.1 Généralités**

La plus grande cause de morbidité et mortalité des patients FK est liée à l'infection à *P. aeruginosa* (48). D'autres pathogènes prennent aussi part à l'infection à différents moments au cours de l'évolution de la maladie : *S. aureus*, *Haemophilus influenza* (*H. influenza*), le complexe *Burkholderia cepacia* (BCC), des espèces d'achromobacters, *stenotrophomonas maltophilia*. (47, 48). L'infection des voies respiratoires inférieures par les pathogènes, fortement présents en FK, exacerbe et accélère la destruction de l'épithélium et du parenchyme pulmonaire (49).

La prévalence des pathogènes varie suivant l'évolution de la maladie des patients au cours du temps. Pendant l'enfance, *H. influenza* et *S. aureus* infectent rapidement les patients FK, puis pendant l'adolescence et chez les jeunes adultes ces pathogènes laissent place graduellement à un pathogène plus néfaste, *P. aeruginosa* (47). L'apparition de l'infection à *P. aeruginosa* est un tournant dans la maladie, associé à un mauvais pronostic de la FK.



**FIGURE 8. Prévalence des microorganismes présents dans les voies aériennes des patients FK en 2013. Tirée du rapport annuel de la CFF 2013.**

Trois de ces infections bactériennes font preuve de beaucoup plus d’attention dans la littérature en raison de leur grande incidence, *P. aeruginosa*, *BCC* et *S. aureus* (50). Les patients FK sont plus susceptibles aux infections comme *S. aureus* et *P. aeruginosa* que la plupart des patients non-FK infectés (50).

#### 1.4.1.1 *S. Aureus*

La prévalence de l’infection chronique à ce pathogène chez l’enfant FK varie entre 12-57% et peut atteindre jusqu’à 80%. Environ 2,6 à 25,6% d’entre eux seraient infectés par une souche résistante à la méthiciline (SARM) (48). *S. Aureus* était autrefois la principale cause de décès des patients FK (48, 50).

#### 1.4.1.2 Complexe *Burkholderia cepacia* (BCC)

C’est un groupe d’au moins 17 espèces qui compose ce complexe et cause des infections pulmonaires en FK. Entre 0 et 12% des patients FK présentent une infection chronique à ce complexe qui est facilement transmissible entre patients FK et qui, de plus, est fortement résistant aux antibiotiques. Les patients infectés par ces pathogènes ont des risques de mortalité élevés suite aux multiples complications qui peuvent s’en suivre. *BCC* est capable d’hiberner dans les macrophages et il est donc très difficile à éradiquer. De ce fait, la

transplantation pulmonaire de ces patients est compliquée et le taux de mortalité dans la première année suivant la transplantation est très élevé. Certaines cliniques de transplantation ont même ajouté ce complexe de pathogènes sur la liste des contre-indications à la transplantation (48).

#### **1.4.1.3 *Stenotrophomonas Maltophilia***

L'infection chronique causée par *S. Maltophilia* est commune en FK (4-17%), mais demeure difficile à identifier. Ces infections sont associées aux développements d'allergie bronchopulmonaire aspergilleuse. La résistance aux antibiotiques dans ce pathogène est souvent observée (48).

#### **1.4.1.4 *P. aeruginosa***

L'infection par ce pathogène opportuniste est rarement observée auprès des personnes en santé, mais est très fréquente pour les patients hospitalisés, les patients souffrant de maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC), les patients ayant une défaillance immunitaire ou au niveau de la barrière naturelle de défense, comme les patients FK. C'est un microorganisme opportuniste (51) ayant une incidence variant en fonction de l'âge des patients FK; de 19 à 50% chez les enfants jusqu'à 60-70% lorsqu'ils atteignent la vingtaine (48, 50). Généralement, des infections sporadiques de *P. aeruginosa* vont avoir lieu à partir de la naissance, jusqu'à l'installation de l'infection chronique (50). La période annuelle d'infection la plus grande coïncide avec celle des virus respiratoires. Comme il peut vivre en condition anaérobie, ce pathogène peut rester localisé dans certains foyers, lui permettant d'infecter de nouveau les poumons (48).

Les modifications génétiques et phénotypiques fréquentes de cette bactérie au cours de la maladie lui permettent de s'adapter à différents milieux et à l'environnement des voies aériennes FK (52, 53). Ainsi, les organismes planctoniques qui infectent d'abord les voies aériennes s'adaptent rapidement pour développer un mode de croissance en biofilm. Il y a alors diminution de l'expression de la flagelline, qui normalement active des cascades impliquées dans la réponse immunitaire. Plus l'infection persiste, plus le phénotype évolue pour devenir mucoïde. Une surexpression de l'alginate en résulte, ce qui protège *P. aeruginosa* contre les cellules immunitaires en créant une barrière physique. De plus, ce

phénotype est associé à une plus grande résistance aux antibiotiques (52), entraînant un déclin plus rapide de l'état de santé des patients FK comparativement aux patients infectés avec du *P. aeruginosa* non mucoïde (54).

*P. aeruginosa* synthétise et sécrète un large éventail de facteurs de virulences comprenant entre autres des élastases, lipopolysaccharides (LPS), exotoxines, pyocyanines qui ont pour effet de rendre l'environnement favorable à sa survie et à sa prolifération (46).

### **1.4.2 Foyers d'infection et interactions entre les pathogènes**

Il existe une association marquée entre les bactéries isolées dans les voies aériennes proximales et profondes. Certaines niches situées dans les sinus paranasaux permettent à des souches comme *P. aeruginosa* d'infecter le poumon de nouveau. Il a été montré que les bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus* présentes au niveau de lavages nasaux ont plus de 80% de similitudes génotypiques avec leurs homologues trouvés dans les crachats (50), indiquant la présence de différents foyers bactériens dans les voies respiratoires. Ces foyers au niveau des sinus paranasaux permettent aux bactéries de se diversifier, de s'adapter à l'environnement des patients FK et finalement de devenir résistantes aux antibiotiques. Ceci favorise l'installation de nouvelles infections pulmonaires, plus adaptées et plus résistantes que la précédente pour conduire à l'infection chronique (55). Il est donc souhaitable de traiter le plus tôt possible, dès la première apparition du pathogène, avec des antibiotiques afin d'espérer repousser l'infection chronique et permettre un meilleur pronostic (56).

Le *quorum sensing* (QS) est le processus par lequel les bactéries communiquent entre elles et régulent la production de leurs facteurs de virulences. En effet, le QS regroupe la production, la détection et la réponse aux molécules signalisatrices. En fait, le QS contrôle la sporulation, la production de facteurs de virulences ainsi que la majeure partie de l'expression des gènes. Il est aussi relié à la croissance en biofilms. Plusieurs molécules sont impliquées dans les cascades engendrées par le QS et vu leurs importances, le QS est l'objet de beaucoup d'attention (57).

Les infections fongiques, à *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans* notamment, sont aussi de plus en plus présentes dans la pathologie de la FK. Par contre, leur importance dans le

décours de la maladie et dans le déclin de la fonction pulmonaire est encore mal comprise (47).

Finalement, les infections virales ont elles aussi leur part à jouer. Pour les patients FK, en particulier pour les jeunes enfants, elles peuvent mener à de sévères complications (47). Il a été rapporté par exemple que les rhinovirus augmentent l'adhérence de *S. aureus* et *H. influenza* aux cellules épithéliales primaires (58) tandis que l'infection au virus respiratoire syncytial augmente l'adhérence de *P. aeruginosa* (59), favorisant ainsi l'infection bactérienne.

#### **1.4.2 Mécanismes d'interactions entre l'épithélium et *P. aeruginosa***

Certains microorganismes comme *H. influenza* et *S. aureus* n'adhèrent pas aux cellules ciliées, mais peuvent avoir des effets cytotoxiques dans les voies aériennes par le biais de sécrétions. La présence de ces pathogènes peut stimuler l'exocytose du mucus, désorganiser le battement ciliaire et/ou induire la perte de cellules ciliées, ce qui diminue la fonction de clairance mucociliaire (51). Ces mécanismes contribuent donc à la persistance des bactéries dans les voies aériennes, dont *P. aeruginosa*.

L'adhésine des pilis de *P. aeruginosa* pourrait adhérer à la surface des cellules épithéliales lésées alors que les adhésines non piliées interagiraient plutôt avec les mucines et les cellules phagocytaires. Les infections initiales de *P. aeruginosa* sont associées au phénotype pilié, ce qui joue pour une grande part de cette infection/adhésion (51). Il a aussi été montré que les zones desquamées où les éléments de la matrice extracellulaire sont alors dénudés (incluant la fibronectine et la laminine) sont des cibles de liaisons du pathogène (46). L' $\alpha 5\beta 1$ -intégrine des cellules épithéliales ainsi que la fibronectine cellulaire sont aussi des ligands et des récepteurs sur lesquels *P. aeruginosa* peut adhérer (60).

Les cellules non polarisées, comme les cellules en migration dans une plaie en vue de la réparation/régénération sont aussi fortement susceptibles à l'adhérence et l'invasion de *P. aeruginosa* (61, 62). De plus, les bactéries peuvent envahir ou pénétrer entre les jonctions intercellulaires et *via* des récepteurs basolatéraux, elles peuvent ainsi pénétrer à l'intérieur de la cellule et survivre à l'abri des mécanismes de défenses de l'organisme (61). De plus, les cellules en retrait de la plaie peuvent devenir plus sensibles aux facteurs de virulences à la suite d'une exposition aux facteurs de croissance hépatocytaires (HGF) dont les niveaux sont



élevés dans certaines pathologies. Ainsi malgré l'absence de lésions, les HGF augmentent la susceptibilité aux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (63).

Les neutrophiles jouent aussi un rôle très important dans l'élimination de *P. aeruginosa*, (64). Par contre, certaines molécules sécrétées par cette bactérie peuvent interagir avec les neutrophiles et diminuer leur efficacité. Par exemple, la pyocyanine réduirait la quantité de chimiokines et de cytokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles et accélérerait leur mort cellulaire programmée par apoptose *in vivo* (64). La pyocyanine affecte aussi le battement ciliaire ainsi que la vitesse du mucus diminuant davantage l'élimination des bactéries (65, 66). Des études ont démontré une réduction de la viabilité cellulaire, de la production des ROS et une augmentation de la sénescence lorsque des cellules humaines urothéliales sont mises en contact avec la pyocyanine (67). Un effet très semblable a été observé *in vitro*, où des concentrations non létales de pyocyanine entraînent l'arrêt de la croissance et le développement morphologique et biochimique des cellules en sénescence (68).

Finalement, *P. aeruginosa* peut s'adapter génétiquement aux voies aériennes FK afin de mieux proliférer et de survivre malgré l'exposition massive aux antibiotiques. Ainsi, la souche subit diverses mutations dans *lasR* et *mexZ* qui semblent permettre l'expansion et la prolifération de *P. aeruginosa* dans les voies aériennes (53). Les interactions entre l'hôte et les bactéries, en particulier *P. aeruginosa*, sont complexes et peuvent avoir des répercussions importantes sur l'épithélium des voies aériennes.

### **1.4.3 Impact de l'infection et l'inflammation sur le CFTR**

#### **1.4.3.1 Impact de *P. aeruginosa* sur le canal CFTR**

La fonction du canal CFTR, primordiale dans les voies aériennes pour la clairance mucociliaire (voir section 1.3), pourrait également être affectée par l'infection à *P. aeruginosa*.

En effet, il a été en effet montré qu'un des facteurs sensibles à la chaleur sécrétés par *P. aeruginosa*, diminue le transport de Cl<sup>-</sup> par le CFTR en interférant avec les processus de recyclage du CFTR-WT et du CFTR-F508del dans les cellules humaines des voies aériennes polarisées. Ce facteur diminuerait également la mise en place à la membrane du CFTR-

F508del induite par un traitement à basse température (27°C). Toutefois, l'impact de l'infection sur la correction fonctionnelle de CFTR dans les cellules FK n'a jamais été évaluée (69). Il a été rapporté également que *P. aeruginosa* augmente la dégradation de CFTR par le lysosome dans les cellules humaines bronchiques *in vitro* (70). De plus, MacEachran *et al.* ont montré que le facteur inhibiteur du CFTR (Cif) sécrété par *P. aeruginosa* inhibe l'expression et la sécrétion de Cl<sup>-</sup> via CFTR-WT (71). La présence de *P. aeruginosa* *in vivo* et *in vitro* pourrait également réduire l'expression de CFTR par un mécanisme dépendant de la protéine NHERF1 (Facteur régulateur 1 de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) (72). Un autre facteur sécrété par *P. aeruginosa*, la pyocyanine, diminue aussi le courant Cl<sup>-</sup> CFTR-WT (73). Inversement, l'exposition au LPS augmenterait les courants Cl<sup>-</sup> par le CFTR-WT via un effet sur le recyclage de la protéine à la membrane (74).

Ainsi, plusieurs évidences montrent un impact de *P. aeruginosa* sur le CFTR-WT, mais les effets sont fortement dépendants des souches utilisées, des types cellulaires et du temps d'exposition. Les effets observés de *P. aeruginosa* sur le CFTR laissent présager que les thérapies envisagées permettant la correction fonctionnelle du CFTR-F508del en FK, avec des correcteurs et des potentiateurs (voir section 1.8), pourraient être moins efficaces dans un contexte infectieux. Des expérimentations supplémentaires sont donc nécessaires afin de définir précisément l'impact de cette bactérie sur le CFTR-WT ainsi que sur la correction du CFTR-F508del avec les nouvelles molécules correctrices.

#### **1.4.3.2 Impact de l'inflammation sur le canal CFTR**

L'infection et l'inflammation sont fortement reliées et sont deux facteurs très présents en FK. Les neutrophiles, en grand nombre dans les voies aériennes des patients FK, sécrètent de l'élastase neutrophilique dégradant la protéine CFTR. Ce mécanisme passe par l'activation enzymatique de la calpaïne (75). La fonction et l'expression du CFTR sont aussi affectées, *in vitro*, par les espèces azotées réactives de l'oxygène (76). L'état d'oxydation du canal CFTR va modifier les propriétés d'ouverture et la fermeture de celui-ci. (77). Ainsi l'inflammation et l'infection par *P. aeruginosa* pourrait affecter le canal Cl<sup>-</sup> CFTR. De plus, ces deux composantes jouent un rôle déterminant dans le développement progressif de lésions au niveau pulmonaire.

#### 1.4.4 Impact lésionnel

Chez les nouveaux nés FK de moins de deux semaines, une diminution de la circonférence de la trachée et de la lumière est décrite ce qui facilite l'obstruction des voies aériennes. En absence d'infection à ce stade chez le patient FK, ces changements seraient plutôt dus au défaut de base de CFTR (78). D'importants changements morphologiques et ultrastructuraux sont ensuite observés chez les patients FK au fur et à mesure que la pathologie progresse (79). De la bronchiectasie et de la bronchiolectasie sont les anomalies prédominantes observées au niveau des poumons d'enfants FK décédés (80). Il est à noter qu'un enfant FK sur trois de moins de trois ans présente de la bronchiectasie (81). Des zones avec des lésions sévères épithéliales sont également observées ainsi des zones présentant une métaplasie squameuse dite malpighienne. Ce type de remaniement épithélial peut conduire à la formation d'une dysplasie associée à un statut clinique plus grave (82). De plus dans les coupes de poumons de patients FK collectés après une transplantation, la présence d'hyperplasie des cellules basales et sécrétrices ainsi qu'une hypertrophie des glandes a aussi été notée (79).

##### 1.4.4.1 Infection

L'infection participe activement au développement de ces lésions pulmonaires. En fait, les métalloprotéinases (MMP) sont des régulateurs de la réponse épithéliale rapide à une infection à *P. aeruginosa* dans le poumon (83). Les MMP-1 et 9 des patients FK ont une activité augmentée, ce qui crée un déséquilibre entre les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP) et les MMP (84). La constante présence de *P. aeruginosa* ainsi que de plusieurs autres pathogènes dans les voies aériennes des patients FK donne lieu à des réactions inflammatoires dérégulées au niveau des bronches et des bronchioles ce qui mènent finalement à la détérioration des voies aériennes du patient (46). En effet, l'élastase sécrétée par *P. aeruginosa* affecte les jonctions épithéliales dans les voies aériennes permettant une augmentation de la perméabilité épithéliale menant à la formation de lésions dans les voies aériennes (85).

De plus, la capacité de croissance de *P. aeruginosa* en biofilm rend difficile son élimination et permet d'établir une inflammation chronique. Celle-ci cause alors davantage de

dommages pulmonaires comprenant des bronchiectasies et de l'emphysème, diminuant la fonction pulmonaire (48).

#### **1.4.4.2 Inflammation**

Après l'exposition à un pathogène, un nombre impressionnant de neutrophiles sont recrutés dans les voies aériennes. Dans un contexte non pathologique, l'inflammation vient en réponse à l'infection afin de la contenir et l'éliminer. Cependant, une réponse inflammatoire dérégulée et excessive est observée en FK (86).

Plusieurs marqueurs inflammatoires sont présents chez les enfants FK en très bas âge, alors qu'ils ne présentent pas encore d'infection. Une augmentation des neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires (BALF), de l'élastase neutrophilique ainsi que de l'interleukine (IL-8), un puissant chimioattractant des neutrophiles, ont été observés. De plus, une augmentation de l'ARNm pour l'IL-8 dans les macrophages a aussi été notée chez ces enfants. Même si une inflammation, dominée majoritairement par les neutrophiles est observée dans les BALF de patients FK (49), la cause est incertaine et les résultats sont encore sujets à la controverse. Des études *in vitro* sur des cellules primaires épithéliales ne montrent pas de changement au niveau de l'activation de NF- $\kappa$ B ou de la sécrétion d'IL-8 des cellules FK, comparativement aux non-FK (87). La quantité anormale de neutrophiles dans les voies aériennes des patients peut en partie être expliquée par l'apoptose déficiente de ceux-ci (86). Comme les neutrophiles finissent par subir de la nécrose, tout leur contenu cellulaire se retrouve alors en contact avec les cellules épithéliales (86). L'ADN et l'actine des neutrophiles nécrosés augmentent encore davantage la viscosité du mucus et contribuent ainsi à la déficience de la clairance mucociliaire. Les neutrophiles nécrotiques libèrent aussi de l'élastase qui contribue grandement aux lésions structurelles de l'épithélium en dégradant l'élastine et certaines autres protéines des parois des voies aériennes FK (84). De plus, ils augmentent l'obstruction des voies aériennes en interférant avec le battement ciliaire, la sécrétion de mucus, la réabsorption de Na<sup>+</sup> par ENaC diminuant ainsi davantage la clairance des pathogènes (86). Les neutrophiles permettent aussi la persistance des bactéries par le clivage d'opsonines et de récepteurs qui sont nécessaires à la phagocytose (86). Les bactéries responsables de l'infection favorisent la sécrétion de chimioattractants des neutrophiles

permettant l'invasion des neutrophiles qui contribuent ensuite à la destruction des poumons, constituant un « cercle vicieux inflammation-lésion-infection » (86, 88).

Il a été montré qu'une corrélation négative liait la FEV<sub>1</sub> et l'inflammation qui est observée par les comptes de leucocytes et de neutrophiles (89). Cette réponse inflammatoire en FK est aussi caractérisée par l'augmentation de myéloperoxydase (MPO), d'IL-1 $\beta$  (90) et de protéines réactives C (CRP) (89). Une autre cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6, est fortement augmentée en FK (91). Une augmentation des lymphocytes T et B ainsi que des neutrophiles dans les poumons de patient FK collectés après transplantation a également été observée (92). Il y a donc une accumulation de mucus infecté qui laisse alors moins d'espace pour le passage de l'air et des échanges gazeux. En outre, une augmentation de la présence des neutrophiles, de macrophages et de cellules T est observée au niveau des voies aériennes humaines FK (48).

En réponse aux filtrats de *P. aeruginosa*, la sécrétion d'IL-8 se fait de manière dose dépendante sans atteindre de plateau par les cellules FK alors que la réponse des cellules non-FK tend à décliner après avoir atteint son maximum. Ainsi en FK, certaines conditions physiopathologiques induiraient une réponse inflammatoire exagérée (87). Il a alors été proposé par certains auteurs que les mécanismes permettant de limiter la réponse inflammatoire seraient absents ou déficients chez les personnes atteintes de FK (93).

En résumé, *P. aeruginosa* en créant une inflammation, des lésions épithéliales et en affectant le CFTR, va ainsi nuire à l'intégrité et à la fonction de l'épithélium pulmonaire. Les lésions qui sont créées promeuvent l'adhérence de *P. aeruginosa*, perpétuant ainsi une boucle sans fin d'infection, d'inflammation et de lésions. Il est devenu alors évident que les mécanismes de réparation de l'épithélium sont primordiaux à la résolution de l'infection et à la régénération d'un épithélium fonctionnel.

## **1.5 Réparation épithéliale bronchique**

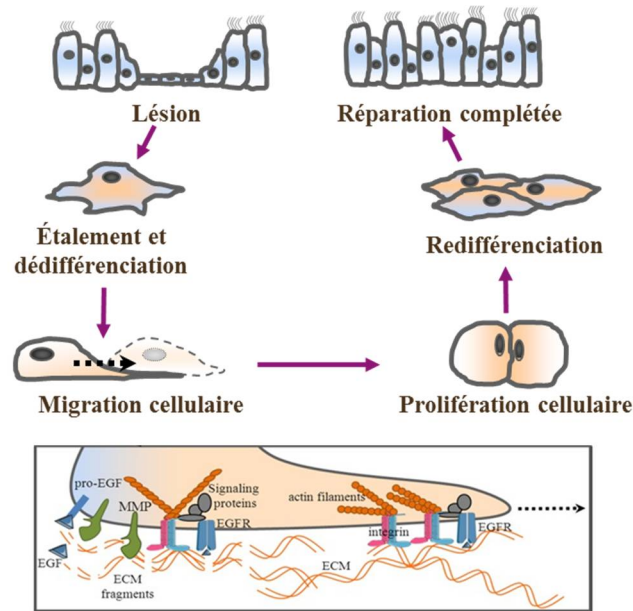
### **1.5.1 Mécanismes impliqués en réparation**

Suite aux dommages, des mécanismes complexes sont mis en place afin de réparer et régénérer l'épithélium. En effet, pour répondre à ce type d'agression tissulaire, les cellules bordant les plaies se différencient, s'étalent puis migrent pour recouvrir le plus rapidement

les surfaces dénudées (94). S'en suit une étape de prolifération et enfin ces cellules se redifférencient pour créer *de novo* un épithélium intact et fonctionnel (95, 96). La réparation implique de nombreux acteurs moléculaires (84).

Chacune de ces étapes peut être régulée par de nombreux facteurs de croissances (facteur de croissance épidermique (EGF), facteur de croissance des fibroblastes (FGF) ), les cytokines/chimiokines, les prostaglandines et les protéases par exemple. Ces nombreux facteurs solubles sont sécrétés par les cellules épithéliales, les fibroblastes, les macrophages, les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire (ECM) en réponse aux lésions et à l'inflammation (95). Une des voies cytoplasmiques majeures qui permet la régulation de la migration de la cellule est la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (97).

Afin de réparer les dommages, la cellule suit une succession d'étapes et transformations dépendant de diverses interactions et molécules. Il a en effet pu être observé dans les cellules en migration une polarisation selon l'axe du mouvement (97) accompagnée d'une relocalisation de plusieurs protéines membranaires (98). L'apex de la cellule appelé le lamellipode est mince et dépourvu d'organelle. Lors de la migration, quatre étapes sont nécessaires : la protrusion (formation de lamellipode en avant de la cellule), l'adhérence du lamellipode, la translocation et la rétraction (97). Ce phénomène requiert des changements au niveau de la structure de la cellule, c'est-à-dire la polymérisation de l'actine à l'avant de la cellule et des protéines contractiles à l'arrière de la cellule (97). Les changements et les réorganisations de l'actine sont régulés par des membres de la famille des Rho GTPases (95). De plus, les intégrines trouvées sur les cellules épithéliales, permettant l'adhérence à la matrice extracellulaire (ECM), jouent aussi un rôle prépondérant dans la réparation épithéliale (99). En effet, le processus de migration nécessite l'interaction de récepteurs, comme les intégrines, qui permettent la formation et le relâchement des points d'adhérence focaux avec la ECM nécessaire à la traction de la cellule vers l'avant (95, 97, 98). Les MMP, dont l'expression est augmentée dans la réparation (95), participent activement au processus de migration (98) et de remodelage cellulaire (95).



**FIGURE 9. Mécanismes impliqués dans la réparation épithéliale.** *Adaptée de Girault et al, 2014.*

Plusieurs canaux ioniques permettent aussi de contrôler la migration cellulaire en régulant notamment le volume cellulaire ou le potentiel de membrane (97, 98). Certains canaux, tels que les canaux calciques régulent l'adhérence, dépendante du pH (97). De plus, différents canaux  $K^+$  ont un rôle crucial dans la réparation en partie via leur relation physique et fonctionnelle avec les intégrines (97, 98, 100). Finalement, certains canaux sodiques et  $Cl^-$ , tels que les canaux CFTR et ANO-1 sont également impliqués dans la réparation épithéliale (79, 97, 101).

### 1.5.2 Implication du canal CFTR en réparation

Plusieurs évidences ont montré un rôle du canal CFTR dans la réparation épithéliale des voies aériennes. En effet, l'inhibition pharmacologique du canal ou la diminution de l'expression protéique de celui-ci avec des petits ARN interférents (siRNA) réduit la vitesse de réparation des plaies des monocouches de cellules humaines bronchiques. La migration permettant en partie la réparation épithéliale semble nécessiter l'activité du CFTR pour atteindre son potentiel maximum de réparation (79, 102). De plus, la perte du CFTR semble affecter la formation des lamellipodes nécessaires à la migration (102).

### 1.5.3 Réparation en FK

Différentes études prouvent que la réparation de l'épithélium des voies aériennes FK est retardée et anormale (84). En effet, un délai de réparation a été montré dans l'épithélium bronchique FK, même en absence d'infection (79, 101). Ce retard serait dû, au moins en partie, au dysfonctionnement du CFTR (79, 102). Ruffin *et al.* ont observé qu'un autre canal Cl<sup>-</sup>, ANO1, semble aussi être diminué en FK, et pourrait avoir un rôle dans le délai de réparation observé (101). De plus, la régénération laisse place à un remodelage épithélial, en particulier une hyperplasie des cellules basales et un retard dans la différenciation des cellules ciliées (103, 104). Au sein de cet épithélium remodelé, l'expression et la sécrétion d'IL-8, de certains MMP et TIMP sont altérés (104). L'infection et l'inflammation participent aussi à ces processus de remodelage (32, 104). L'altération de l'épithélium respiratoire amplifie sa dysfonction et il est donc primordial de stimuler sa régénération.

### 1.5.4 Impact de l'infection sur la réparation

*P. aeruginosa* est connu pour être résident des lésions chroniques (105). En effet, elle lie les cellules des voies aériennes *in vitro* aux sites des lésions préexistantes et semble interagir préférentiellement avec les cellules en bord de plaies (106) fortement impliquées dans les processus de réparation (95). Dans les plaies des patients brûlés infectés par *P. aeruginosa*, la pyocyanine produite par ce pathogène entraîne la sénescence des fibroblastes qui compromet alors la régénération du tissu de la peau en inhibant des mécanismes impliqués dans la réparation et la cicatrisation (107). Le groupe Muller *et al* a montré que la pyocyanine induit la sénescence cellulaire des fibroblastes en interférant avec la voie de signalisation des MAP kinase (MAPK) p38 (107). Il a aussi été établi que l'élastase sécrétée peut être impliquée dans l'inhibition de la réparation des cellules épithéliales cancéreuses en lignées, mais d'autres mécanismes doivent être impliqués, car la souche PA103 qui ne sécrète pas d'élastase conserve un effet inhibiteur de la réparation (106). *P. aeruginosa* sécrète aussi une protéine, l'ExoT de type III, qui inhibe la réparation de ces mêmes cellules (106).

Plusieurs facteurs de virulences sécrétés par *P. aeruginosa* peuvent provoquer des lésions (106, 108). Ces facteurs produits par *P. aeruginosa* jusqu'à la phase stationnaire de croissance inhibent la réparation des cellules primaires humaines épithéliales en altérant la



polymérisation du cytosquelette d'actine ralentissant ainsi la migration et la formation des lamellipodes. Bentzmann et al, suggèrent aussi que la suractivation des MMP-2 et 9 conduit à la dégradation des signaux de la matrice et des récepteurs, perturbant ainsi les interactions entre la matrice et les cellules. Les auteurs attribuent donc à ces facteurs le retard de migration et de restauration de l'intégrité de l'épithélium après la fermeture de la plaie (108).

Des travaux précédents de notre laboratoire ont démontré que des molécules correctrices de CFTR permettent non seulement d'améliorer la fonction de CFTR, mais également d'augmenter la vitesse de réparation de l'épithélium bronchique (79). Toutefois, cet effet bénéfique n'avait pas été évalué en condition infectieuse. Puisque nous suspicions que le CFTR pouvait être affecté par l'infection, nous étions convaincus que des investigations supplémentaires étaient nécessaires pour évaluer la réparation de l'épithélium FK, corrigé ou non, en condition infectieuse.

## **1.6 CFRD**

### **1.6.1 Description du CFRD**

Avec une prise en charge plus efficace de la pathophysiologie respiratoire et pancréatique, l'espérance de vie des patients FK n'a cessé d'augmenter et de nouvelles pathologies associées comme le diabète sont apparues (36, 109). Le CFRD, décrit comme une pathologie distincte en 1955 (36), affecte environ 2-9% des patients de 5-9 ans, 19% des adolescents, 40% des jeunes adultes, et atteint environ 50% des patients FK adultes de plus de 30 ans (36). De plus, cette nouvelle manifestation de la pathologie est associée à une morbidité et mortalité 6 fois plus élevées (109).

La sécrétion d'anions altérée dans le conduit proximal pancréatique des patients FK entraîne la production de liquide riche en protéines qui obstrue celui-ci amenant progressivement au dommage pancréatique et à son atrophie (109, 110). Les cellules des îlots pancréatiques sont initialement intactes. Cependant, de nombreux facteurs conduisent à la destruction des îlots de Langerhans des patients FK souffrant d'IP, entraînant une déficience à l'insuline et au glucagon (26, 109-111). L'apoptose des cellules  $\beta$  entraîne l'insulinopénie (36) accompagnée d'une résistance à l'insuline variable en fonction des patients et de l'état

infectieux de ceux-ci (111). Il y a donc une corrélation entre les génotypes associés à l'IP et la présence du CFRD. Les patients FK qui ont un antécédent de diabète familial ou ceux porteurs de gènes prédisposant au diabète de type 2 sont aussi plus à risque de développer un diabète de FK (110). Le CFRD partage des caractéristiques avec les deux types de diabètes déjà connus, mais des différences pathologiques et cliniques lui confère une classification différente (112).

Le développement vers le CFRD se fait en plusieurs étapes : la première est une hyperglycémie postprandiale transitoire, qui peut évoluer vers une intolérance au glucose, puis vers un CFRD sans hyperglycémie à jeun, pour finalement arriver à un CFRD avec hyperglycémie à jeun (110). L'implication du stress oxydatif dans le diabète de type 1 et 2 a été rapportée dans plusieurs études (36). Or, un stress oxydatif a bien été décrit dans les patients FK (113). Il est donc probable que l'une des causes du développement du CFRD soit le stress oxydatif (36). L'inflammation et l'infection permettant le recrutement massif de neutrophiles sont des sources importantes d'espèces réactives d'oxygènes (ROS) et donc de stress oxydatif (36, 111, 114). De plus, l'accumulation de CFTR mal replié au niveau du RE occasionne aussi du stress oxydatif. La perte du transport de glutathion au niveau pulmonaire par la perte du CFTR s'ajoute à ce déséquilibre, causant davantage de stress oxydant qui peut mener à la dysfonction et l'apoptose des cellules  $\beta$ , et conduire à l'insulinopénie (26, 36). Finalement, l'hyperglycémie est aussi un facteur important dans l'augmentation du stress oxydatif (111), qui s'ajoute à celui déjà présent en FK.

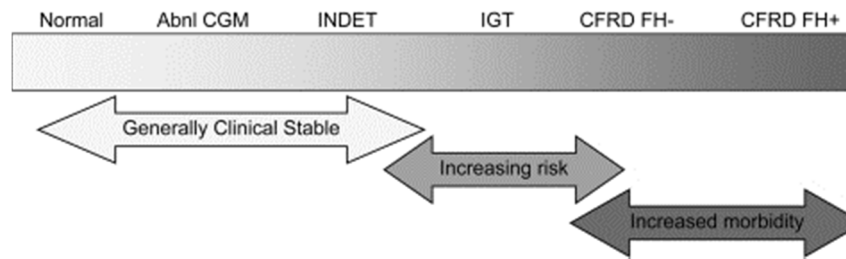
Les épisodes d'infection aigüe peuvent conduire à une augmentation de la résistance à l'insuline (110), mais la majorité des patients CFRD ont une réponse à l'insuline normale (26) (111). Le facteur de risque majeur causant l'insulinorésistance est l'obésité qui caractérise les patients atteints de diabète de type II. Des études récentes démontrent que plus de 15% des patients FK pourraient avoir un surpoids ou souffrir d'obésité, ce qui pourrait expliquer l'insulinorésistance chez ce groupe de patients FK (115). Toutefois, l'infection et la prise de corticostéroïdes semblent aussi être des hypothèses pouvant expliquer la résistance à l'insuline.

## 1.6.2 Impact pulmonaire du CFRD

Le CFRD affecte la fonction pulmonaire, la période la plus critique étant l'adolescence (116). Il semble que la mortalité accrue des patients avec CFRD soit majoritairement causée par la détérioration plus rapide de la fonction pulmonaire et non par les complications vasculaires qu'entraîne normalement le diabète (36). En effet, aucun cas de patient FK décédé pour cause de maladie d'athérosclérose cardiovasculaire n'a été rapporté (112).

Pour les patients diabétiques ne souffrant pas de maladie pulmonaire, le diabète est associé à un déclin de la fonction respiratoire entre 2-4% comparativement aux non-diabétiques (36). Cet impact, minime pour les patients n'ayant pas de maladie pulmonaire à la base, peut-être plus important pour les patients FK qui ont déjà une santé pulmonaire fragile. Plusieurs phénomènes, dont l'infection, pourraient permettre d'expliquer cette observation. En effet, la concentration en glucose de l'ASL est augmentée et deux des pathogènes associés au déclin de la fonction pulmonaire en FK, *S. aureus* et *P. aeruginosa* ont une croissance fortement augmentée dans ces conditions (36, 117). Le diabète est ainsi un facteur associé à un nombre accru d'exacerbations et contribue à la multirésistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* (117). Enfin, *P. aeruginosa* permet une diminution de la résistance transépithéliale et celle-ci permet l'augmentation du flux paracellulaire de glucose (117).

Le déclin de la fonction pulmonaire des patients FK précède généralement le diagnostic de CFRD (109, 113), la fonction respiratoire des patients FK est d'autant plus affectée que la déficience à l'insuline est sévère (109, 118). En outre, la détection plus précoce de niveaux de glucose anormaux, par la surveillance du glucose en continue (CGM), a permis d'associer ces anomalies à la détérioration du poumon (119). Finalement, une atteinte plus rapide de la structure pulmonaire est observée chez les patients CFRD comparés aux patients FK sans diabète (120).



**FIGURE 10. Détérioration de l'état clinique des patients FK associée à l'apparition des anomalies liées au glucose.** Surveillance à domicile du glucose en continu anormale (Abnl CGM), glycémie indéterminée (INDET), tolérance au glucose altérée (IGT), sans hyperglycémie à jeun (FH-) et avec hyperglycémie à jeun (FH+). *Adaptée de Moran et al, 2010.*

Une augmentation du catabolisme des protéines, engendrées par la déficience à l'insuline, est l'une des hypothèses envisagées pour expliquer la perte de fonction pulmonaire (111). En effet, celle-ci est fortement dépendante de l'indice de masse corporelle et de la masse maigre du patient (112). Or, l'insuffisance à l'insuline favorise le catabolisme des protéines et compromet le statut nutritionnel et la prise de poids du patient (112). Ce nouveau facteur (l'insuffisance à l'insuline) s'ajoute à l'insuffisance pancréatique et au problème d'absorption intestinale qui, lorsque non traités, causent un problème pour la croissance des patients FK.

Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la dégradation de la fonction pulmonaire suite à l'exposition à l'hyperglycémie, mais le mécanisme n'est toujours pas élucidé.

### 1.6.3 Impact du CFRD sur la réparation épithéliale et le transport ionique

La présence d'insuline chez les personnes sans pathologie associée stimulerait la synthèse des protéines et de l'ADN des cellules présentes autour des lésions cutanées et favoriserait ainsi la réparation du tissu et la régénération de l'épiderme (121). Inversement, la présence de fortes concentrations de glucose altère la fermeture de plaies de la cornée de porc et interfère avec la voie de signalisation PI3-kinase/Akt (122). De plus, lorsque le diabète est induit chez le porc, celui-ci présente un retard de réparation au niveau de la peau (123). Des

études *in vitro* montrent aussi une diminution de la motilité des kératinocytes humains en réponse à un traitement avec de grandes concentrations de glucose. Lan *et al.* indiquent que cette réponse pourraient être médiée par deux voies, *phosphorylated signal transducer and activator of transcription-1* (p-Stat-1) et  *$\alpha 2\beta 1$ -integrin-mediated MMP-1*, supprimées en présence d'hyperglycémie (124). D'autres études ont montré que les cornées de rat, en présence d'hyperglycémie pendant plusieurs mois, montrent un défaut de réparation. Ces cellules en présence d'hyperglycémie présentent une diminution de l'activation du récepteur à l'EGF (EGFR) et des voies de signalisation en aval, résultant en une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire (125). Cependant aucune observation ne semble avoir été faite au niveau pulmonaire.

Des canaux ioniques sont aussi affectés par l'hyperglycémie. Par exemple, l'activité des canaux potassiques activés par le calcium (BKCa) dans un système d'expression est diminuée par l'hyperglycémie, ce phénomène serait responsable d'une diminution de la prolifération et une altération de l'apoptose (126). Inversement, l'activité du cotransporteur au  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2 \text{Cl}^-$  (NKCC), qui permet de maintenir le volume cellulaire adéquat, est augmentée par de fortes concentrations de glucose (127). D'autre part, l'expression des canaux  $\text{K}^+$  voltage dépendant (Kv) semblent être augmentée en présence d'hyperglycémie dans les cellules pancréatiques  $\beta$  (128).

Le transport ionique et la réparation épithéliale sont deux fonctions primordiales de l'épithélium des voies aériennes. Ces deux fonctions semblent affectés dans d'autres tissus, cependant celles-ci n'ont pas été étudiées extensivement dans l'épithélium bronchique FK en présence d'hyperglycémie et/ou CFRD, bien que la concentration en glucose soit plus importante dans l'ASL dans un contexte d'hyperglycémie (117).

## 1.7 Thérapies

À l'heure actuelle, les patients FK sont pris en charge par différents spécialistes dont des nutritionnistes, physiothérapeutes, pneumologues, otorhinolaryngologistes en fonction des pathologies associées développées et en fonction des besoins du patient. Quatre-vingt-dix pourcent des patients présentent de l'insuffisance pancréatique, ils prennent donc des enzymes pancréatiques enrichies de suppléments et de vitamines. De plus, ils suivent une diète spéciale

pour les aider à maintenir leur poids et éventuellement le diabète qui atteint plus de 30% des jeunes adultes FK. À cela s'ajoute toute la médication pour la pathologie pulmonaire comprenant des bronchodilatateurs (permettant un meilleur effet des antibiotiques inhalés), des thérapies ciblant l'ASL et le mucus, ainsi que des antibiotiques inhalés en prophylaxie ou lors des surinfections. S'ajoutent aussi à celle-ci les thérapies mécaniques de physiothérapies ou l'utilisation des vestes vibrantes facilitant l'élimination du mucus (129). En plus de ces thérapies axées sur les symptômes (voir sections 1.7.1 à 1.7.5), des thérapies curatives adaptées à chaque classe de mutations afin de traiter le défaut de base sont en développement (section 1.7.7 à 1.8).

### **1.7.1 ASL et mucus**

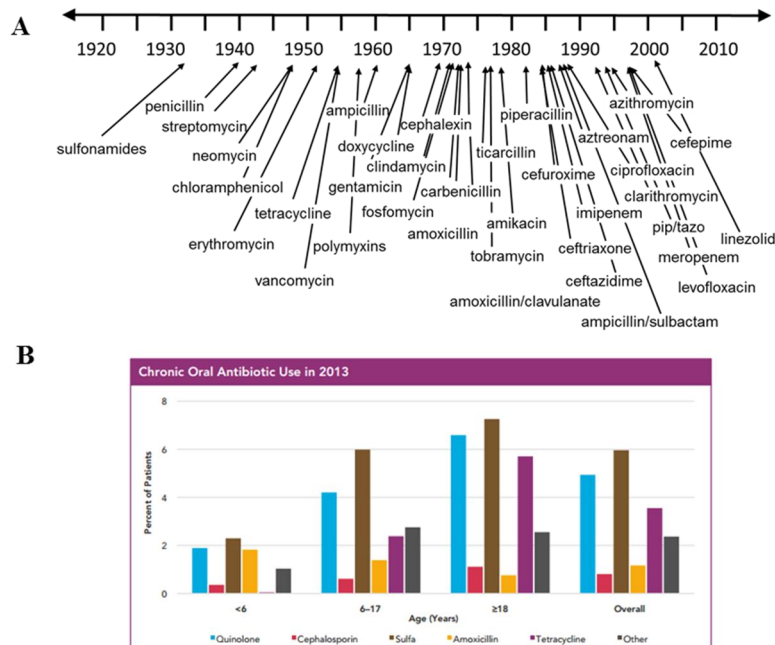
Des stratégies ont été développées afin d'augmenter la fluidité du mucus en facilitant la sécrétion liquidienne par l'inhalation de solution hypertonique ou osmotique comme le mannitol (28, 130). Le Bronchitol, un inhalateur de mannitol, semble être efficace et a des effets bénéfiques sur la fonction respiratoire et les exacerbations. La réduction du mucus par la prise d'agent mucolytiques comme la DNase 1 est aussi utilisée et permet une amélioration de la fonction pulmonaire (130). D'autres composés, comme l'acide hyaluronique, semblent prometteurs. Ils peuvent agir comme agent lubrifiant permettant les interactions entre le mucus et l'épithélium des voies aériennes pour une clairance mucociliaire adéquate, mais ces molécules sont toujours à l'étude (131).

### **1.7.2 Traitement de l'infection**

Probablement une des raisons importantes de l'augmentation de l'âge médian de survie des patients FK est liée à l'antibiothérapie. Depuis les dernières années, plusieurs antibiotiques de différentes classes et sous différentes formulations sont arrivés sur le marché afin de traiter les infections pulmonaires (132). Lors des périodes d'exacerbations trop importantes, les antibiotiques pris oralement ne sont pas suffisants et les antibiotiques intraveineux ou inhalés sont alors utilisés (9). Plusieurs pathogènes sont visées, mais plus particulièrement *P. aeruginosa* qui est la plus fréquemment retrouvée en FK (132).

Diverses molécules sont disponibles afin de tenter d'éradiquer les infections telles que l'aztréonam, antibiotique dirigé contre *P. aeruginosa*. Son effet demeure maximal lorsque les bactéries se développent sous forme planctonique, mais beaucoup moins efficace lorsqu'elles présentent la forme mucoïde. Le levofloxacin est aussi un antibiotique qui s'attaque à *P. aeruginosa* en inhibant la topoisomérase, une enzyme nécessaire à la synthèse de l'ADN (132). La tobramycine, le colistin et plusieurs autres sont aussi couramment utilisés.

Cependant, les bactéries s'adaptent et développent des résistances aux antibiotiques, ce qui nécessite le renouvellement constant de ces derniers. Plusieurs stratégies sont à l'étude afin de déjouer ces mécanismes. La prise d'échantillon par BALF et expectoration de crachats permettent la culture bactérienne *in vitro* et donc la détermination des antibiotiques efficaces contre les diverses souches présentes (9). Une meilleure compréhension des composantes du QS de *P. aeruginosa* pourrait permettre également d'établir des cibles efficaces (133). Certains antibiotiques comme les macrolides peuvent avoir des effets antibiotiques en inhibant des facteurs de virulence, la formation de biofilm et le QS de *P. aeruginosa*. L'azithromycine fait partie de cette catégorie d'antibiotiques et semble être efficace bien que son effet pourrait être dû en partie à une action anti-inflammatoire (134). Cependant son mécanisme d'action est encore mal connu (135).



**FIGURE 11. Aperçu des antibiotiques développés depuis 1920 et des antibiotiques oraux utilisés en prophylaxie pour différentes tranches d'âge en 2013.** A) Adaptée de la présentation de John LiPuma NACFC 2014 et B) Tirée du rapport annuel de la CFF 2013.

### 1.7.3 Traitement de l'inflammation

La réponse inflammatoire, bien qu'essentielle pour la défense de l'organisme, est exagérée en FK et nécessite donc d'être prise en charge à un stade précoce pour éviter les dommages irréversibles de la structure pulmonaire. De ce fait, des traitements anti-inflammatoires combinés aux antibiotiques font partie de la pratique thérapeutique générale. En fait, ces thérapies anti-inflammatoires visent à contrôler l'accumulation des cellules inflammatoires et immunitaires (130). Évidemment, la prise d'antibiotiques intraveineux permet de diminuer l'inflammation, mais la prise chronique de ceux-ci n'est pas possible et donc des thérapies visant directement l'inflammation sont nécessaires (135).

#### 1.7.3.1 Corticostéroïdes

Ces anti-inflammatoires permettent de limiter la formation de mucus, mais aussi l'activation, l'adhérence et la chimiotaxie des leucocytes. De plus, ils permettent l'inhibition



de l'activation de la voie pro-inflammatoire par NFκB (86, 134). L'inhalation des corticostéroïdes (ICS) est efficace chez les jeunes enfants avant l'apparition des lésions irréversibles, mais à long terme elle a des conséquences dommageables (134). En effet, bien que les ICS permettent de ralentir la chute de la fonction pulmonaire, ils diminuent le poids et la croissance des patients en plus d'augmenter l'utilisation d'insuline et d'agent hypoglycémiant. Son utilisation n'est donc pas recommandée pour les traitements à long terme (135).

#### **1.7.3.2 Ibuprofène**

L'ibuprofène est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) efficace et plus sécuritaire qui permet une diminution du déclin de la fonction pulmonaire, une meilleure conservation du poids et donc moins d'hospitalisation (134). À forte dose, l'ibuprofène a un effet spécifique sur les neutrophiles en inhibant notamment leur migration (86). Il est maintenant conseillé comme traitement par la CFF (134) et il est pour le moment le seul anti-inflammatoire recommandé pour le traitement à long terme des patients FK (135).

#### **1.7.3.3 Antioxydant**

Les molécules oxydantes sont des cibles de choix compte tenu de leurs présences importantes dans les voies aériennes FK et de leur rôle destructeur. De plus, les molécules antioxydantes ont un potentiel thérapeutique de par leurs modes d'action variés. En effet, elles peuvent avoir un effet mucolytique, correcteur du défaut de base en FK ou régulateur de l'expression des mucines en plus de contrôler l'inflammation (136).

#### **1.7.3.4 Autres agents agissant sur l'inflammation**

Plusieurs autres agents comme des modulateurs eicosanoïdes, des anti-cytokines, des inhibiteurs des protéases ainsi que plusieurs autres types de molécules intervenant dans la cascade inflammatoire FK (86, 134) font l'objet d'études et méritent encore beaucoup d'attention avant de pouvoir être utilisés en clinique.

### 1.7.4 Thérapie génique

La thérapie génique permet l'introduction de matériel génétique dans une cellule ou un organisme avec l'intention de guérir une maladie génétique. La FK, causée par la mutation d'un seul gène, est donc une candidate parfaite pour ce genre de thérapie. Depuis l'identification du gène *CFTR* impliqué dans la FK en 1989, la thérapie génique a fait l'objet de beaucoup d'attention. Le poumon, organe le plus touché par la pathologie, est donc la cible visée par cette thérapie. Toutefois, les cellules ciliées, et toutes les cellules immunitaires déjà présentes dans le poumon forment une barrière difficile à franchir par les vecteurs viraux. La taille importante du transcrit et l'instabilité du CFTR sont d'autres obstacles à cette thérapie. Ainsi lors des premiers essais, une amélioration transitoire du courant CFTR-WT a été observée suite à la première administration, mais l'efficacité était perdue avec la répétition du traitement. La réponse inflammatoire exacerbée suite à l'administration des vecteurs viraux a été un autre obstacle majeur. Depuis 2001, le « *UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium* » a relancé cette stratégie et deux études sont présentement en cours : l'une portant sur de nouveaux vecteurs viraux et l'autre sur un plasmide dépourvu de motifs CG non méthylés qui peuvent provoquer une réponse immunitaire. Les résultats préliminaires de cette dernière sont intéressants et les effets d'une dose répétée pendant douze mois devraient être disponibles au cours de l'année 2015 (137).

([http://www.cfgenetherapy.org.uk/clinical/article/Multi\\_Dose\\_Clinical\\_Trial\\_20122014](http://www.cfgenetherapy.org.uk/clinical/article/Multi_Dose_Clinical_Trial_20122014))

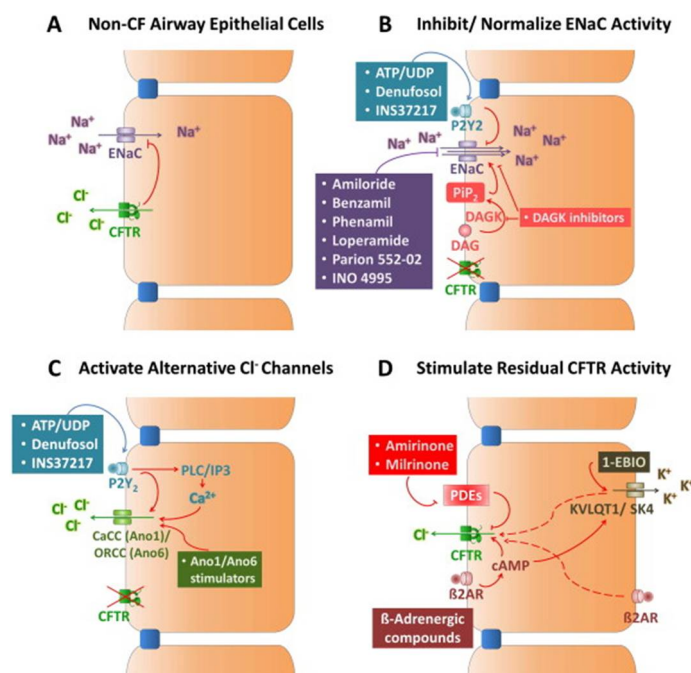
### 1.7.5 Transplantation

Lorsque l'atteinte pulmonaire est trop importante, la seule option de survie pour les patients FK sera une transplantation pulmonaire. La société internationale de transplantation cardiaque et pulmonaire (ISHLT) a publié que 16,4% des transplantations pulmonaires mondiales étaient effectuées chez des patients FK (138). Leur survie après 5 ans est de 60% et la médiane est de 8,3 ans, soit un taux plus élevé que chez la population générale transplantée. Un des critères déterminant le besoin d'une transplantation est une FEV<sub>1</sub> inférieure à 30%, qui est associée à 50% de mortalité en moins de deux ans en absence de transplantation. Chez l'adulte, il semble clair que la transplantation est une option nécessaire afin de prolonger la

vie du patient, mais chez l'enfant sa pertinence est encore controversée et elle est peu pratiquée (138).

### 1.7.6 Thérapies visant d'autres canaux

Divers autres canaux que le CFTR sont impliqués dans le transport ionique et liquidien de l'épithélium respiratoire. Certaines équipes étudient donc des options alternatives aux transports de  $\text{Cl}^-$  par le CFTR ou permettant d'augmenter la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  par les canaux CFTR résiduels présents à la membrane plasmique. Cependant le CFTR a aussi un rôle dans la sécrétion/transport du bicarbonate et du glutathion qui sont aussi affectés en FK et qui apportent des changements au niveau de l'environnement des voies aériennes. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si ces stratégies améliorent aussi leurs sécrétions.



**FIGURE 12. Thérapies ciblant des canaux alternatifs au CFTR.** A) Cellule épithéliale des voies aériennes non-FK, B) stratégies inhibant le canal ENaC, C) stratégies activant des canaux  $\text{Cl}^-$  alternatifs et D) stratégies stimulant les canaux  $\text{Cl}^-$  CFTR résiduels. *Tirée de Bell et al, 2014.*

#### **1.7.6.1 ENaC**

Des thérapies visant à augmenter le PCL et donc à hydrater le mucus sont aussi à l'étude en bloquant le canal sodique ENaC. L'amiloride qui est un inhibiteur de ce canal a déjà fait l'objet d'études, mais son efficacité est courte et faible. De plus, son action non spécifique sur des aquaporines a limité son utilisation. D'autres molécules inhibitrices de ENaC font l'objet d'études actuellement (1, 28).

#### **1.7.6.2 CaCC**

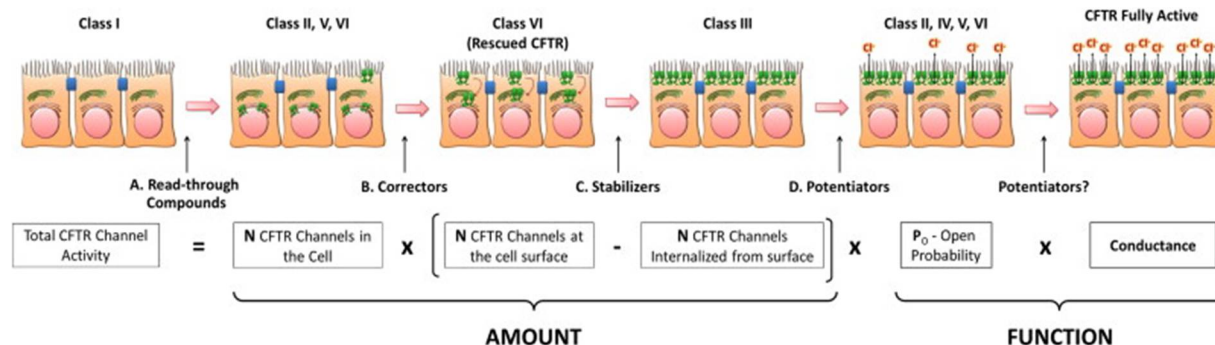
L'inhalation d'UTP a été étudiée afin d'activer la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  par les canaux CaCC apicaux. L'activation de ces canaux permet aussi l'interaction avec les voies purinergiques influençant la probabilité d'ouverture du canal ENaC (28). Ainsi, il y a donc une double action en diminuant l'absorption de  $\text{Na}^+$  par le canal ENaC et en augmentant la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ . Toutefois, l'effet de l'UTP est très transitoire et d'autres molécules apparentées sont donc sur les bancs d'essai (1, 28). ANO1, un membre des canaux CaCC, est candidat pour ce genre de thérapie. Cependant, il a été montré qu'ANO1 est régulé à la baisse en condition pathologique de la FK, ce qui pourrait limiter les effets bénéfiques de l'activation de ces canaux (13, 101).

#### **1.7.6.3 Canaux $\text{K}^+$**

L'activation des canaux  $\text{K}^+$  comme  $\text{K}_v\text{LQT1}$  ou le  $\text{KCa3.1}$  est une autre option envisagée afin d'augmenter le gradient électrochimique et forçant ainsi la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  par les canaux CaCC ou CFTR résiduels (1).

### **1.7.7 Thérapies ciblées par classe de mutations du CFTR**

Les thérapies plus ciblées par patients et par classes sont aussi envisagées. Elles sont une alternative à la thérapie génique puisqu'elles visent à corriger le défaut de base de CFTR, incluant son expression à la membrane plasmique et sa fonction.



**FIGURE 13. Thérapies envisagées pour chacune des classes de mutations.** Stratégies permettant la meilleure activité du canal CFTR. A) Composés permettant de passer outre les codons-stops, B) correcteurs, C) stabilisateurs, D) potentiateurs. *Tirée de Bell et al, 2014.*

### 1.7.7.1 Classe I

Des antibiotiques comme la gentamicine permettent la lecture du transcrit malgré la présence d'un codon-stop prématuré et ainsi la synthèse d'une protéine fonctionnelle (1, 13). Présentement, une deuxième étude de phase III est en cours pour évaluer l'efficacité d'une molécule nommée Ataluren (PTC-124), déjà utilisée dans le cadre d'une autre maladie résultant d'un codon-stop : la dystrophie musculaire de Duchenne. Il a déjà été montré que l'Ataluren facilite la production d'une protéine CFTR complète et localisée à la membrane apicale (139). Toutefois, d'après les résultats de la phase III, le traitement à l'Ataluren n'a pas permis d'améliorer la FEV<sub>1</sub>, bien que celle-ci ait déclinée moins vite que dans le groupe placebo (140). Il est possible que des interactions aient lieu avec la tobramycine, un antibiotique fortement utilisé pour les patients FK. (141). De plus, les effets semblent varier selon la mutation de classe I présente (13, 140).

### 1.7.7.2 Classe II

Les thérapies axées sur les mutations de classe II sont discutées à la section 1.8.

### 1.7.7.3 Classe III

#### *Potentiateurs*

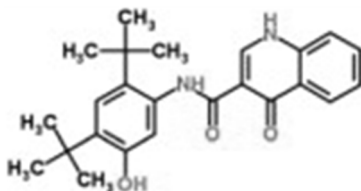
Les premiers potentiateurs du CFTR, ciblant les mutations de classe III caractérisées par un CFTR adressé à la membrane mais dysfonctionnel, incluaient des flavones (génistéine), xanthines et benzimidazoles (142). Certains potentiateurs, comme le VRT-532, peuvent agir

de manière directe sur le CFTR muté G551D ou F508del en restaurant l'activité GTPase nécessaire à l'ouverture du canal. D'autres agissent plutôt sur des interactions protéine-protéine. Des mécanismes indirects via l'AMPc par inactivation de phosphatase peuvent aussi faire partie des mécanismes de potentialisation (142).

#### Vx-770 (Ivacaftor)

Au départ, cette molécule avait seulement été développée pour une mutation spécifique de cette classe, la G551D. Le Vx-770 permet d'augmenter la probabilité d'ouverture du canal dépendante de l'ATP. Cette molécule permet aussi d'augmenter l'activité du canal CFTR d'autres mutations de classe III qui présentent des caractéristiques communes au G551D, telles que les mutations G178R, S549N, S549R, G551S, G970R, G1244E, S1251N, S1255P et G1349D (143). Ainsi la Food and Drug Administration (FDA) a étendu l'approbation de cette molécule à ces différentes mutations. Il s'agit donc du premier traitement disponible contre le défaut de base du CFTR en FK (<http://www.cff.org/treatments/Pipeline>). Les patients hétérozygotes et homozygotes pour ces mutations peuvent maintenant en bénéficier (1). D'autres potentiateurs sont aussi à l'étude (<http://www.cff.org/treatments/Pipeline>) et continuent d'être développés par différentes compagnies.

Des études cliniques avec ce potentiateur ont aussi été menées auprès des patients FK homozygotes F508del. Comme attendu, aucun changement au niveau de la FEV<sub>1</sub> n'a été remarqué, puisque le repliement de la protéine F508del est défectueux, mais la sécrétion de Cl<sup>-</sup> dans la sueur était légèrement diminuée ce qui supporte l'idée qu'une petite quantité de CFTR-F508del atteint la surface apicale et que ceux-ci sont sensibles aux potentiateurs (142).



**FIGURE 14. Structure de la molécule potentiatrice Vx-770. Tirée de Birault et al, 2013**

#### **1.7.7.4 Classe IV**

Des théories défendent l'idée que ces mutations, résultant en un phénotype moins sévère, bénéficieraient de la combinaison d'un correcteur et d'un potentiateur afin d'augmenter le nombre de canaux CFTR à la membrane et sa conductance (1). Cependant, à ma connaissance aucune étude clinique n'est actuellement en cours pour évaluer cette stratégie pour ces patients.

#### **1.7.7.5 Classe V**

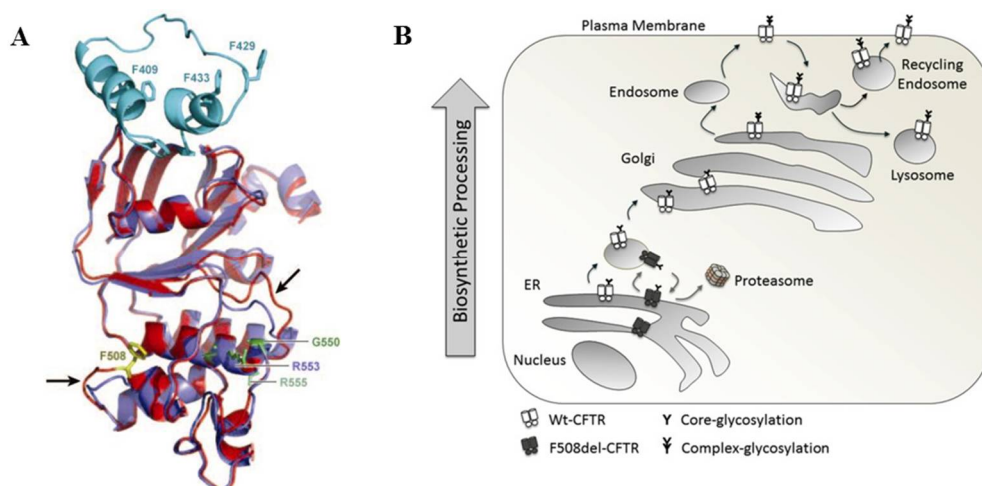
L'utilisation du correcteur en combinaison avec un potentiateur semble aussi une option envisageable pour cette classe afin d'augmenter la quantité de CFTR à la membrane et permettre une meilleure activation (1).

#### **1.7.7.6 Classe VI**

Cette classe regroupe des protéines présentes à la membrane, mais instables et internalisées rapidement. Les stabilisateurs comme les activateurs de Rac 1 permettant l'ancrage au cytosquelette d'actine par le *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory cofactor 1* (NHERF1), comme le HGF, pourraient améliorer la correction par le Vx-809 en stabilisant probablement le CFTR F508del corrigé, qui présente alors des caractéristiques semblables à la classe VI (1).

### **1.8 Thérapie pour la classe II**

La mutation de classe II la plus répandue est la délétion du résidu F508. En conséquence, beaucoup d'attention est portée à cette mutation, présente chez 70 à 90% des patients FK. Cette délétion est située dans l'hélice  $\alpha$  du NBD1. Le NBD1 du CFTR-F508del a été étudié plus finement et a révélé une altération dans la stabilité thermique. D'autres études ont montré que le CFTR-F508del présente un défaut dans la régulation par la phosphorylation (144).



**FIGURE 15. Comparaison entre le NBD1 du CFTR-F508del et du CFTR-WT et leur synthèse.** A) Superposition de la représentation du NBD1 WT (en rouge) et F508del (en violet). Tirée de Riordan, 2008. B) Le processus de synthèse du CFTR-WT qui permet une glycosylation complète (complex-glycosylation) par l'appareil de Golgi et qui est recyclé par l'endosome (*recycling endosome*). Le CFTR-WT est dégradé par le lysosome comparativement au CFTR-F508del qui est dégradé par le protéasome en quittant le RE (ER) alors qu'il est glycosylé de base (*Core-glycosylation*). Tirée de Molinski et al, 2012.

La conformation du CFTR dans le RE implique différentes chaperonnes qui empêchent son agrégation (144). Le CFTR-F508del a une association prolongée avec certaines chaperonnes comme la canexine de type lectine comparativement au CFTR-WT, ce qui pourrait retenir la protéine mutée dans le RE. Reconnu comme une protéine aberrante, mal repliée, le CFTR-F508del est donc ubiquitiné et dégradé par le protéasome (145). De plus, lorsque le CFTR-F508del parvient à la membrane, il a une demi-vie plus courte que le CFTR-WT (145) et il présente un défaut de régulation l'empêchant de s'activer correctement (146). Afin de modifier l'adressage à la membrane de ce canal, plusieurs types de molécules ont été développés *in vitro*.

### 1.8.1 Correcteurs

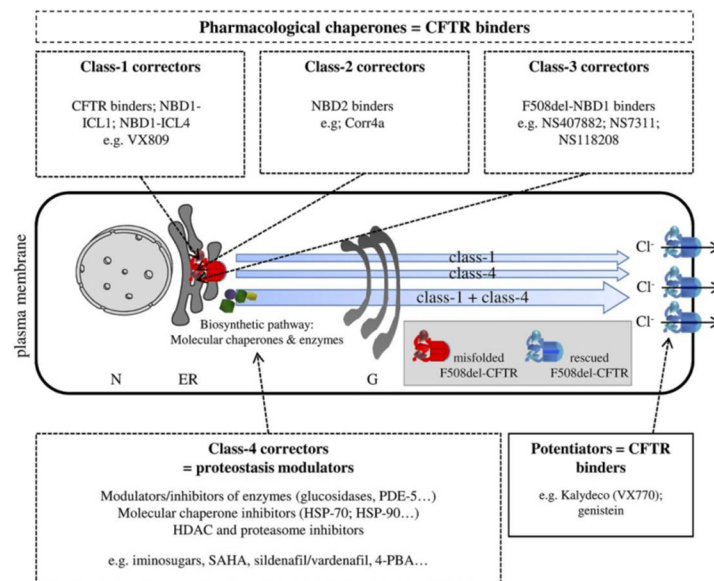
Différentes stratégies peuvent permettre la maturation du CFTR-F508del : par exemple en agissant sur le NBD1 ou sur les interactions inter-domaines afin de permettre un repliement adéquat de la protéine ou encore en interférant avec divers points de contrôle dans le RE pour ainsi libérer la protéine mutée (147). La mutation du CFTR-F508del empêche non seulement



le repliement adéquat de la protéine mais entraîne également une baisse de sa stabilité à la membrane. Des études *in vitro* ont montré que des petites molécules pouvaient intervenir sur ces différents aspects (148). En effet, les correcteurs sont des composés qui lient directement le CFTR, stabilisent la protéine ou qui agissent par d'autres mécanismes, par exemple en inhibant les voies de dégradation (145).

En fait, il a été observé qu'un phénotype moins sévère semble présent chez les patients FK ayant une mutation résultant en un courant de 5-30% du courant CFTR-WT. Il a donc été proposé qu'une correction conduisant à un minimum de 5-10% du courant CFTR-WT serait suffisante pour avoir un effet bénéfique en clinique (148, 149). En effet, il a été montré *in vitro* qu'une maturation de seulement 20% du CFTR-F508del est suffisante pour générer 70% du courant CFTR-WT (150) et que 25% sont suffisants pour restaurer la clairance mucociliaire (151).

### 1.8.1.1 Mécanismes d'action



**FIGURE 16. Classes de correcteurs et leur action sur le CFTR muté.** Tirée de Boinot et al, 2014.

### *Chaperonnes Pharmacologiques*

Les chaperonnes pharmacologiques sont les molécules correctrices les plus spécifiques qui agissent sur différentes étapes de la synthèse protéique et du contrôle de la qualité. Elles peuvent inhiber des interactions avec des chaperonnes moléculaires qui maintiennent le CFTR-F508del dans le RE (152). En fait, une chaperonne efficace ne doit permettre l'adressage à la membrane que de la protéine cible. Cependant, il est difficile de savoir quel correcteur est vraiment une chaperonne, car la liaison directe des molécules au CFTR est très difficile à déterminer (145). Les correcteurs qui semblent agir directement sur le CFTR sont classés en 3 catégories.

1 : Les correcteurs de cette classe stabilisent l'interface NBD1-MSD1 (boucle intracellulaire 1) et NBD1-MSD2 (boucle intracellulaire 4). Le Vx-809 fait partie de cette classe (153, 154).

2 : Cette classe de correcteurs regroupe les molécules liant le NBD2 ou son interface. Cette classe comprend le corr-4a, qui est toutefois non spécifique du CFTR (147, 153).

3 : Ces correcteurs lient le NBD1 du CFTR-F508del, stabilisent le NBD1 et permettent les interactions moléculaires (153).

### *Modulateur du protéasome*

Les modulateurs du protéasome ne sont pas les correcteurs à privilégier puisqu'ils sont non spécifiques du CFTR. Ils représentent donc de bons outils, mais comme ils diminuent aussi la dégradation d'autres protéines, ils comportent des risques d'effets secondaires (145). Le Miglustat et le KM11060, un analogue du Sildénafil, font partie de cette catégorie (153, 155).

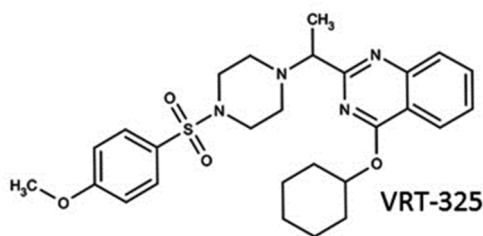
### *Autres molécules correctrices*

L'ibuprofène, qui a précédemment (section 1.7.3.2) été discuté en lien avec son rôle anti-inflammatoire recommandé en FK, semble aussi agir comme correcteur, par l'inhibition de la cyclooxygénase 1 (COX1). Toutefois, compte tenu des résultats divergents, d'autres études sont nécessaires afin de confirmer son effet correcteur (156). Des inhibiteurs des récepteurs tyrosines kinases sont aussi des correcteurs potentiels du CFTR-F508del puisqu'ils

augmentent le courant  $\text{Cl}^-$  CFTR dans les cellules épithéliales humaines bronchiques (HBE) (157).

#### 1.8.1.2 Correcteur VRT-325

Le VRT-325, une quinazoline, semble lier directement le CFTR-F508del. Son action semble être médiée par un effet allostérique qui induit une conformation semblable au CFTR-WT lui permettant de quitter le RE sans être dégradé (158). Il agit, selon certaines études, en restaurant les interactions inter-domaines au niveau des MSD (144). Malheureusement, le VRT-325 n'est pas spécifique du CFTR et permet l'adressage à la membrane d'autres protéines, telles que la p-glycoprotéine ou le canal voltage dépendant, *human ether-à-go-go related gene*, hERG qui suivent un processus d'adressage semblable au CFTR (149). De plus, de fortes concentrations de VRT-325 peuvent inhiber le courant  $\text{Cl}^-$  CFTR (144). Cette molécule reste toutefois un bon outil, utilisé dans de nombreuses études *in vitro* (147, 154, 158).



**FIGURE 17. Structure de la molécule correctrice VRT-325.** Tirée de Molinski et al, 2012.

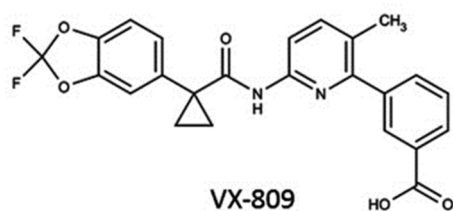
#### 1.8.1.3 Correcteur Vx-809 (Lumacaftor)

Le Vx-809, ou Lumacaftor, permet d'augmenter le courant  $\text{Cl}^-$  des cellules HBE FK F508del pour atteindre environ 14% du courant des HBE non-FK, ce qui devait être suffisant pour avoir un effet bénéfique. Pour les patients, les résultats de phase II ont montré que le produit est sécuritaire et permet une diminution des ions  $\text{Cl}^-$  dans la sueur de manière dose-dépendante. En revanche, la correction de CFTR n'était malheureusement pas accompagnée d'amélioration de la fonction pulmonaire (149, 159).

Il a été montré que le Vx-809 permet une maturation du CFTR lorsque l'instabilité thermique du CFTR-F508del est compensée par la réduction de la température (147, 160). Le

Vx-809 n'a donc pas d'activité thermostabilisante, ce qui pourrait expliquer pourquoi la forme mature corrigée par cette molécule n'a pas une longue vie (160). Ainsi, en présence de Vx-809, la protéine serait assemblée, mais la thermostabilité ne serait pas augmentée. En effet, l'assemblage et la stabilité thermique ne sont pas reliés étroitement (160). Ainsi, les effets du correcteur employé seul sont mitigés et des études *in vitro* montrent peu de correction fonctionnelle après son application (161). De plus, les études cliniques sur le Vx-809 employé seul ont été abandonnées, faute d'effet bénéfique significatif (141). Par contre, un fait intéressant est que le Vx-809 permet aussi la maturation du CFTR avec certaines mutations comprises dans des boucles intracellulaires et dans le MSD1 (160, 162).

Le site de liaison du Vx-809 et des différents correcteurs est très difficile à identifier puisque la protéine CFTR complète est elle-même difficile à étudier compte tenu de sa taille et de sa complexité (discuté dans la section 1.2). Les études proposent que le Vx-809 puisse agir à l'interface entre le NBD1 et le TMD2 (147), lie le MSD1 et stabilise CL1-CL4 permettant l'interaction avec NBD1 (154). Le Vx-809 semble aussi directement lier le TMD1 (163). D'autres études sont donc nécessaires afin d'éclaircir son mécanisme, mais le Vx-809 semble spécifique du CFTR comparativement au VRT-325 ou au Corr-4a qui eux permettent l'augmentation d'autres protéines telles que le canal hERG (163).



**FIGURE 18. Structure de la molécule correctrice Vx-809.** Tirée de Molinski et al, 2012

### 1.8.2 Combinaisons de correcteurs et potentiateurs

Une nouvelle option thérapeutique pour la correction de CFTR est donc l'utilisation d'une combinaison de ces molécules correctrices qui par leur synergie ou effet additif permettrait de corriger plus efficacement le défaut de repliement et maturation de la protéine ainsi que sa dysfonction (147, 164). Pour atteindre ce but, les défauts majeurs structurels

engendrés par la mutation F508del doivent être corrigés soit au niveau de la stabilité du NBD1 soit au niveau du défaut entre les NBD et les MSD (164). La combinaison de molécules semble nécessiter des agents qui agissent à différents niveaux dans la synthèse, la stabilisation du CFTR-F508del comme le repliement, l'adressage, la stabilité membranaire, et la fonction (147, 154, 165). Ainsi, la combinaison de correcteurs appartenant à des catégories différentes ou liant le CFTR à des endroits différents, comme c'est le cas par ex du VRT-325 et du Vx809, est aussi envisagée et permet d'avoir une activité correctrice additive, voire synergique (147, 154). Ceci supporte l'idée que plus d'un mécanisme cellulaire est impliqué dans la reconnaissance cellulaire et la dégradation du CFTR-F508del.

La combinaison d'un potentiateur et d'un correcteur est une approche qui permet une fonction plus importante du CFTR-F508del (142). Des études *in vitro* montrent que la combinaison du Vx-809 et le Vx-770 augmente davantage l'activation du canal CFTR-F508del que le traitement par le Vx-809 seul (161). De plus, les résultats de phase II avec du Vx-809, en combinaison avec le Vx-770 indiquent que les patients homozygotes portant la mutation F508del présentent une amélioration de leur FEV<sub>1</sub>, ainsi qu'une diminution du CI<sup>-</sup> dans leur sueur (141, 166). Les résultats des phases III indiquent aussi une amélioration significative de la fonction pulmonaire. Une demande a donc été déposée en novembre 2014 pour une approbation par la FDA, pour le traitement des patients homozygotes F508del avec cette combinaison. Par contre, cette thérapie combinée n'a pas eu les effets escomptés pour les patients hétérozygotes ayant une seule mutation F508del (<http://www.cff.org/>).

Un autre correcteur développé par Vertex, le Vx-661 (homologue au Vx-809), est aussi en étude clinique en combinaison avec le Vx-770, car il ne semble pas avoir d'effet sur l'amélioration de la fonction pulmonaire lorsqu'il est employé seul. La phase II de cette combinaison a montré des résultats prometteurs sur la fonction pulmonaire et les études de phase III sont en cours (<http://www.cff.org/>).

Des molécules à double activité, correctrice et potentiatrice, ont aussi été développées et sont à l'étude (142).

D'autres molécules comme le nucléotide phosphodiesterase cyclique 4 (PDE4) au rôle régulateur de l'activation du CFTR dépendante de l'AMPC et de la PKA, amplifie l'action des

correcteurs/potentiateurs lorsqu'il est inhibé (167). Des molécules inhibant le PDE4 ont donc un potentiel intéressant et méritent de plus amples investigations.

Les résultats précédents du laboratoire ont mis en évidence pour la première fois un effet des correcteurs du CFTR sur la réparation épithéliale bronchique FK (79). Une stratégie permettant la maturation et la correction fonctionnelle du canal plus efficace pourrait avoir un bénéfice plus important sur la réparation épithéliale. Cependant, l'effet de *P. aeruginosa* sur CFTR pourrait altérer cet effet bénéfique et des investigations de ces combinaisons dans des conditions infectieuses sont nécessaires.

## Chapitre 2; Hypothèses et Objectifs

### 2.1 Préambule

Les dommages épithéliaux apparaissent précocement dans les poumons des patients FK, avant même l'établissement de l'infection chronique (81, 82). Ces lésions peuvent aussi être causées et amplifiées entre autres par les processus inflammatoires et infectieux. Ce phénomène permet ensuite aux pathogènes de mieux adhérer à l'épithélium des voies aériennes et ainsi créer un « cercle vicieux » entre l'infection, l'inflammation et les lésions (84, 85). De plus, le déséquilibre ionique engendré par la mutation du *CFTR* participe à la diminution de la clairance mucociliaire (41) permettant la persistance des microorganismes dans les voies aériennes.

Dans les conditions physiologiques normales, des mécanismes de réparation sont enclenchés suite à ces lésions afin de restaurer l'intégrité et la fonctionnalité du tissu épithélial. Toutefois, des études, dont celles de notre laboratoire, ont mis en évidence un retard de réparation et de régénération même en absence d'infection et d'inflammation exogènes (79, 101, 103, 104). Plusieurs caractéristiques des cellules FK, dont leur mémoire inflammatoire, peuvent être impliquées et expliquer en partie ce délai dans la réparation. Cependant, d'après nos données et celles de la littérature, le CFTR joue un rôle dans les processus de réparation et la dysfonction du CFTR en FK participe au retard de réparation (79, 102). D'autres aspects de la pathologie, dont l'infection, contribuent aussi probablement à aggraver ce défaut de réparation épithéliale, essentielle à la régénération d'un épithélium bien différencié et fonctionnel.

De nouvelles thérapies présentement étudiées pour les patients FK visent particulièrement le défaut de base en FK pour permettre la production d'une protéine CFTR adéquatement adressée à la membrane plasmique et fonctionnelle. Les études antérieures faites par le groupe du Dre. Brochiero ont mis, pour la première fois, en évidence un effet bénéfique des composés correcteurs de CFTR sur la réparation de l'épithélium des voies aériennes FK (79). Cependant, il a été montré que l'infection et l'inflammation, deux composantes importantes de la pathologie FK, pouvaient affecter le CFTR-WT et nous avons donc posé

l'hypothèse qu'elles pourraient diminuer l'efficacité de ces thérapies (70, 76). De plus, le vieillissement de la population FK entraîne l'apparition de pathologies associées comme le diabète (CFRD). Il a été établi que cette complication est associée à une baisse plus rapide de la fonction pulmonaire chez les patients FK (116), mais l'effet de l'hyperglycémie sur l'épithélium non FK et FK, en particulier sur la capacité de l'épithélium à se réparer et régénérer après les lésions n'est pas bien connu. D'autre part, l'impact de l'hyperglycémie, associée au CFRD, sur les effets bénéfiques des nouvelles thérapies à l'aide de correcteurs n'a pas été clairement établi.

## **2.2 Hyperglycémie**

### **2.2.1 Hypothèse**

L'hyperglycémie causée par le CFRD, dont environ 50% des adultes FK de 30 ans souffrent, est associée à une diminution de la fonction pulmonaire (36). Baker *et al.* (168) ont montré que la concentration en glucose dans l'ASL augmente avec la présence d'hyperglycémie sanguine chez les diabétiques et les non-diabétiques. Ces concentrations peuvent atteindre jusqu'à 10 fois leur valeur normale (168). En fait, un gradient de glucose est établi entre le pôle apical (concentration plus faible) et basolatéral (plus grande concentration). Ainsi, la concentration en glucose dans les voies aériennes n'atteint pas le niveau sanguin, mais elle est toutefois anormalement élevée (169). Il est donc pertinent d'étudier l'impact d'une telle hyperglycémie au niveau des voies aériennes FK.

Deux des fonctions primordiales de l'épithélium bronchique sont le transport ionique, permettant le maintien de l'ASL et de la clairance mucociliaire, et la capacité de réparation épithéliale. Notre hypothèse est donc que l'hyperglycémie diminue le transport de  $\text{Cl}^-$  et de  $\text{K}^+$  dans l'épithélium des voies aériennes saines et que la réparation épithéliale de ces cellules pourrait aussi être affectée. Finalement, les cellules FK qui présentent déjà un défaut de réparation (79) pourraient voir ce délai aggravé par l'hyperglycémie. De plus, l'effet bénéfique des correcteurs sur le CFTR et sur la réparation pourrait être compromis.



## **2.2.2 Objectifs**

### **2.2.2.1 Impact de l'hyperglycémie sur le transport ionique**

Mon premier objectif était de déterminer l'impact de l'hyperglycémie sur le transport ionique des cellules des voies aériennes bronchiques FK et non-FK. Mon but était, premièrement de vérifier l'effet de l'hyperglycémie sur la fonction des canaux apicaux principaux impliqués dans la sécrétion de  $\text{Cl}^-$ , contrôlant la clairance mucociliaire. La fonction des canaux  $\text{K}^+$  basolatéraux, nécessaires à la formation du gradient électrochimique permettant la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  apicale, a également été comparée en condition normale et hyperglycémique.

### **2.2.2.2 Impact de l'hyperglycémie sur la réparation épithéliale bronchique**

Mon deuxième objectif était d'étudier l'impact d'une exposition de 24h, 48h et 7 jours à une haute concentration de glucose sur les vitesses de réparation de l'épithélium bronchique FK et non FK afin de déterminer si le CFRD aggrave ou non le retard déjà présent en FK.

### **2.2.2.3 Impact de l'hyperglycémie sur l'effet bénéfique de la correction de CFTR sur la réparation épithéliale bronchique FK**

Mon troisième objectif était de déterminer si l'effet bénéfique de la correction du CFTR par le VRT-325 permet une augmentation de la vitesse de réparation des cellules bronchiques des voies aériennes FK malgré une exposition à de fortes concentrations en glucose.

## **2.3 Infection et CFTR**

### **2.3.1 Hypothèse**

Quelques articles soulignent le fait que *P. aeruginosa* pourrait moduler à la hausse ou à la baisse l'activité du CFTR-WT selon les conditions expérimentales. De plus, certains facteurs sécrétés par ce pathogène diminuent l'expression du CFTR-WT (70). Cet impact négatif de *P. aeruginosa* sur le CFTR-WT pourrait avoir des conséquences néfastes au niveau des voies aériennes des patients souffrant de diverses maladies pulmonaires comme la MPOC

et la FK, caractérisées par des infections fréquentes par ce pathogène. Nous avons donc supposé que l'efficacité des correcteurs de CFTR pourrait être affectée par la présence de *P. aeruginosa*, retrouvée chez plus de 60% des adultes FK (50).

## **2.3.2 Objectifs**

### **2.3.2.1 Effet de PsaDM sur le CFTR-WT et F508del**

Mon premier objectif était d'évaluer l'impact d'une exposition aux exoproduits bactériens sécrétés par *P. aeruginosa* (PACF508) sur la fonction et l'expression protéique du canal CFTR-WT et F508del.

#### **2.3.2.2 Mécanisme régulant la diminution de l'expression protéique du CFTR**

Mon deuxième objectif était de déterminer à quel(s) niveau(x) de la synthèse, maturation et/ou dégradation protéique de CFTR, les exoproduits bactériens agissent.

#### **2.3.2.3 Impact du PsaDM sur la correction**

Finalement, mon but était de déterminer si les correcteurs permettent la maturation et la restauration de la fonction du CFTR-F508del malgré une exposition au PsaDM.

## **Chapitre 3; Résultats publiés et contribution aux articles**

### **3.1 Article 1: Deleterious impact of hyperglycemia on Cystic Fibrosis airway ion transport and epithelial repair**

#### **3.1.1 Résumé**

La réparation épithéliale ainsi que le transport ionique sont deux fonctions importantes de l'épithélium des voies aériennes. Il a été établi que le diabète relié à la FK entraîne un déclin plus rapide de la fonction respiratoire. Bien qu'il ait été montré dans d'autres épithéliums, comme la cornée et la peau, que l'hyperglycémie affecte les processus de réparation, peu de données sont disponibles concernant l'épithélium pulmonaire. De plus, les fortes concentrations de glucose altèrent certains canaux  $K^+$ , qui régulent par ailleurs la migration des cellules pancréatiques. Toutefois, l'effet de l'hyperglycémie sur le transport ionique par les cellules épithéliales pulmonaire n'a pas été investigué. Nous avons donc décidé d'étudier l'impact de l'hyperglycémie sur deux types de canaux,  $Cl^-$  et  $K^+$ , ainsi que sur la réparation épithéliale.

Nos résultats démontrent une diminution à la fois du courant  $Cl^-$  CFTR et du courant total potassique basolatéral dans les cellules épithéliales des voies aériennes. De plus, nous avons observé un ralentissement de la fermeture des plaies suite à l'exposition à l'hyperglycémie autant dans les cellules des voies aériennes FK que non-FK.

Nous avons ensuite investigué quel pourrait être l'impact de l'hyperglycémie sur l'effet des nouvelles molécules correctrices du CFTR muté. Nos résultats ont montré que l'effet bénéfique de la correction de CFTR sur la réparation est affecté par les fortes concentrations de glucose, bien que l'amélioration de la fonction du CFTR persiste. De plus amples investigations sont nécessaires à la compréhension du mécanisme en cours.

#### **3.1.2 Contribution**

J'ai débuté les investigations en collaboration avec Olivier Bardou, étudiant au doctorat à ce moment-là au laboratoire et d'Émilie Maillé, assistante de recherche. Lorsqu'Olivier

Bardou a complété son doctorat, j'ai repris en charge le projet et réalisé une large partie des expériences (65%) présentées dans le manuscrit. J'ai aussi participé à l'écriture de l'article et à ses révisions afin d'arriver à la publication de l'article dans le journal J. Cystic Fibrosis sous la supervision de Dre. Brochiero. La version publiée de l'article est jointe en annexe 1.

# DELETERIOUS IMPACT OF HYPERGLYCEMIA ON CYSTIC FIBROSIS AIRWAY ION TRANSPORT AND EPITHELIAL REPAIR

CLAUDIA BILODEAU<sup>1,2</sup>, OLIVIER BARDOU<sup>1,2</sup>, ÉMILIE MAILLÉ<sup>1</sup>, YVES BERTHIAUME<sup>2,3</sup>,  
AND EMMANUELLE BROCHIERO<sup>1,2</sup>

***Running title:*** High glucose impairs ion transport and epithelial repair

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 rue Saint-Denis, Montréal (Québec) Canada H2X0A9; <sup>2</sup>Département de médecine, Université de Montréal, CP6128, Succursale Centre-Ville, Montréal (Québec) Canada, H3C3J7; <sup>3</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), 110 avenue des Pins Ouest, Montréal (Québec) Canada H2W1R7

Corresponding author:

Emmanuelle Brochiero, Ph.D.

CRCHUM, Tour Viger

900 rue Saint-Denis

Montréal, Québec, Canada H2X0A9

## ABSTRACT

**Background:** Cystic fibrosis (CF)-related diabetes (CFRD) is associated with faster pulmonary function decline. Thus, we evaluated the impact of hyperglycemia on airway epithelial repair and transepithelial ion transport, which are critical in maintaining lung integrity and function.

**Methods:** Non-CF and CF airway epithelial cells were exposed to low (LG) or high (HG) glucose before ion current and wound repair rate measurements.

**Results:** CFTR and  $K^+$  currents decreased after HG treatments. HG also reduced the wound healing rates of non-CF and CF cell monolayers. Although CFTR correction with VRT-325 accelerated the healing rates of CF cells monolayers under LG conditions, this improvement was significantly abrogated under HG conditions.

**Conclusions:** Our data highlights a deleterious impact of hyperglycemia on ion transport and epithelial repair functions, which could contribute to the deterioration in lung function in CFRD patients. HG may also interfere with the beneficial effects of CFTR rescue on airway epithelial repair.

**KEYWORDS:** airways, epithelial repair,  $K^+$  channels, CFTR, cystic fibrosis, diabetes

## 1. INTRODUCTION

Improvements in the medical management of patients with cystic fibrosis (CF) have led to a gradual increase in median life expectancy. However, this is associated with emerging co-morbidities, including cystic fibrosis related diabetes (CFRD). The prevalence of this complication increases with age, reaching up to 40% in CF adult patients (for review see (1;2)). The progression from normal glucose tolerance to glucose intolerance, and then to diabetes, is accompanied with a marked increase in morbidity and mortality in CF patients and a faster decline in pulmonary function (1-6). In fact, many lines of evidence indicate that diabetes and hyperglycemia, even in non-CF patients, are associated with reduced pulmonary function compared to control non-diabetic subjects (see review (7)).

The mechanisms underlying the effect of diabetes and hyperglycemia on lung function in diabetic patients have not been clearly defined. However, high blood glucose concentrations, in particular in CF patients, have been associated with elevated levels of glucose in the airway and an increased risk of bacterial infections (8-11). Accordingly, CFRD has been identified as one of the risk factors for both pulmonary exacerbations and their treatment failure (12-14), suggesting a potential decrease in the pulmonary defense against pathogens. Higher levels of oxidative stress and inflammatory mediators may also be responsible for lung tissue injury and remodeling in diabetic patients (15-17). In fact, it seems that structural changes, including bronchiectasis, airway wall thickening and lung parenchymal histological alterations, have been observed in children with CFRD or impaired glucose tolerance, prior to an associated decline in lung function (18).

Ion transport and epithelial repair, which are crucial for lung function and integrity, may also be impacted by diabetes. An equilibrium between  $\text{Cl}^-$  secretion and  $\text{Na}^+$  absorption is indeed necessary to maintain an adequate periciliary liquid volume and functional mucociliary clearance (19;20). In addition,  $\text{K}^+$  channels, particularly  $\text{KvLQT1}$ ,  $\text{KCa3.1}$  and  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , also play a role in the control of ion and liquid transport through the airway epithelia (21). To the best of our knowledge, the impact of hyperglycemia on airway ion transport has not been previously investigated. However, there is evidence that changes in  $\text{K}^+$  currents and the expression of different types of  $\text{K}^+$  channels is modified after modulation of glucose concentrations in  $\beta$ -pancreatic or kidney embryonic cells (22-25). Interestingly,  $\text{K}^+$  channels are also involved in

the regulation of repair processes of several epithelial tissues (26). Our group has shown that KvLQT1,  $K_{ATP}$  and KCa3.1 channels play a role in airway and alveolar cell migration and proliferation as well as wound repair (27-29). Some evidence also points to the involvement of  $Cl^-$  channels (30-32). Our data showed that CFTR function is crucial for airway epithelial repair and that the basic CFTR defect in CF may be responsible, at least in part, for reduced repair rates in CF airway epithelia (32). We also showed that a rescue of the CFTR defect with the CFTR corrector VRT-325 led to improved repair rates of CF airway monolayers (32). However, the impact of hyperglycemia on the repair capacity of non-CF, CF and corrected-CF airway epithelia has not yet been defined.

In light of the evidence that diabetes and hyperglycemia impair the wound-repair capacity of other epithelial tissues (33-35) and affect ion currents and/or channel expression in different cell types (22-25;36), we hypothesized that these crucial functions of the respiratory epithelia may be affected by high glucose levels. To address this, we investigated the effect of exposure of non-CF and CF airway cells to normal glucose (5 mM, low glucose, LG) or 25 mM glucose concentrations (high glucose condition, HG), which has been commonly used to mimic diabetic-like challenge in many studies (23-25;33;35). We then compared the  $Cl^-$  and  $K^+$  currents as well as the repair rates of non-CF and CF airway cell monolayers under both conditions. Our data indicated that high glucose treatment impairs ion transport as well as the ability of airway epithelial monolayers to repair after mechanical injury. This deleterious effect on two crucial functions of the airway epithelia could contribute to the decline in pulmonary function in diabetic patients.



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Cell Culture

CFBE41o- airway epithelial cells (37), transduced with wt-CFTR (CFBE-wt) or  $\Delta$ F508-CFTR (CFBE- $\Delta$ F508) (38), were maintained for 8 days in EMEM (Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 10% FBS (Life Technologies), 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and 100 U/ml of penicillin-streptomycin (Life Technologies) in Petri dishes or for 2 to 4 weeks on permeant filters (Costar Transwell, Corning Inc., Corning, NY) coated with 1 mg/ml BSA (Invitrogen), 0.05 mg/ml bovine collagen I (Invitrogen) and 1 mg/ml human fibronectin (VWR, Mont-Royal, Canada), in LHC medium (Life Technologies Inc., Burlington, ON), as previously described (32). EMEM (containing 5 mM glucose) was supplemented with 20 mM glucose (for a total of 25 mM glucose, high glucose, HG) or 20 mM mannitol (control condition with identical osmotic change, low glucose, LG) 24 h, 48 h or 7 days before experiments.

Primary human airway nasal cells were recovered after polypectomy procedures from CF patients with various genotypes (four homozygous  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508, two  $\Delta$ F508/N1303, one  $\Delta$ F508/undefined and one  $\Delta$ F508/A455E, median age 21.5 yrs, mean FEV1 of  $83.1 \pm 6.1$  %), according to protocols approved by the CHUM ethical committee and with written informed consent by the patients. After dissection, polyps were digested overnight, at 4°C, under gentle agitation in MEM (Invitrogen) supplemented with 7.5% NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Fisher, Ottawa, Canada), 0.05 mg/ml gentamycin (Sandoz, Boucherville, QC), 25 U/ml penicillin-streptomycin, 0.25 µg/ml Fungizone (Invitrogen), 0.1% pronase E (Sigma-Aldrich) and 10 µg/ml DNase (Sigma-Aldrich). After pronase-DNase neutralization, the cells were gently scraped off the remaining tissue. Cells were cultured in petri dishes coated with Purecol (Cedarlane, Burlington, Canada) and maintained in complete SAGM (LHC basal medium supplemented with the SAGM kit (Clonetics, Walkersville, MD) and 25 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich), 100 U/ml of penicillin-streptomycin, 0.07 µg/ml phosphorylethanolamine (Sigma-Aldrich), 1.86 ng/ml ethanolamine (Sigma-Aldrich), 0.05 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich), stock 11, stock 4 and trace elements (32).

## 2.2 Wound-healing assays

Airway epithelial cells cultured on plastic support were injured mechanically with a pipette tip following a highly reproducible technique (29;32;39). Marks under the wells allowed us to photograph the wounds exactly at the same place at time 0 after injury and after 6-h of wound-closure (**Fig. 3A**). The wound repair rates ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) were then measured individually in each wound with ImageJ software, by measuring the wound area at time 0 ( $\mu\text{m}^2$ ) minus the wound area at time 6h ( $\mu\text{m}^2$ ), this value corresponding to the repaired area ( $\mu\text{m}^2$ ), which is then divided by the duration (6h). The same procedure was repeated 12 times (i.e. 6 wounds/well, 2 wells/condition, per experiment (n)) and the mean wound repair rates (among the 12 measurements) were calculated. This method allowed us to correct for variations in the initial wound area. It should be emphasized that our method is highly reproducible and the initial wound area were very similar in size. This commonly employed “wound-healing assay” enables the study of the early mechanisms triggered after injury, i.e. cell migration and proliferation (32). However, we verified that the basal number of proliferative cells in CFBE-wt and CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers during wound repair was similar.

## 2.3 Transepithelial ion currents

Transepithelial ion currents were studied by short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements in an Ussing chamber (28;29;39;40). Briefly, CFBE cells were cultured on filters at the air-liquid interface until they formed a polarized epithelium with high resistance. After exposure to EMEM containing LG (5 mM glucose + 20 mM mannitol) or HG (25 mM glucose) for a 24-h or 48-h period, filters were washed, mounted in a heated (37°C) Ussing chamber, and bathed with a symmetrical physiological solution (containing in mM: 141 NaCl, 5.4 KCl, 0.78  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 0.8  $\text{MgCl}_2$ , 5 glucose, 15 Hepes, pH 7.4) to measure transepithelial currents through intact monolayers. To evaluate the level of  $\text{K}^+$  currents through the basolateral membrane,  $I_{sc}$  was measured after establishment of a  $\text{K}^+$  gradient and permeabilization of the apical membrane with 7.5  $\mu\text{M}$  amphotericin B. The apical-to-basolateral  $\text{K}^+$  gradient was created by bathing the apical side with high  $\text{K}^+$  physiological solution, whereas for the basolateral side, KCl was replaced by an equivalent amount of N-methyl-D-glucamine chloride (NMDG-Cl). To evaluate  $\text{Cl}^-$  currents through the apical

membrane in CFBE-ΔF508 cells, a Cl<sup>-</sup> gradient was established by bathing the cell monolayers with an asymmetrical physiological solution (low Cl<sup>-</sup> concentration solution at the apical side and high Cl<sup>-</sup> concentration at the basolateral side) and the basolateral membrane was permeabilized with 7.5μM amphotericin B. Transepithelial potential difference was clamped to zero by an external voltage clamp amplifier (VCCMC2, Physiological Instruments, San Diego, CA) with KCl agar-calomel half-cells and Ag-AgCl electrodes, and the resulting *I*<sub>sc</sub> was recorded continuously on a computer with a PowerLab system (ADInstruments, Toronto, ON). Membrane resistance (TER) was verified with 1-mV pulses every 10 sec.

#### **2.4 Statistics**

Groups were compared by non-parametric Mann-Whitney tests with GraphPad (La Jolla, CA) for comparison between CFBE-wt and CFBE-ΔF508. Wilcoxon matched paired tests were used for comparison between mannitol vs glucose conditions in the same cell line. For consistency, all data are presented as bar charts with means ± SEM (the number of repeated experiments (n) is indicated in the figure legends). A probability of *P*<0.05 was considered to be statistically significant.

### 3. RESULTS

First, we assessed the impact of high glucose levels on ion transport, which is crucial for airway epithelial function. Airway CFBE cells cultured on permeant filters were mounted in an Ussing chamber after 24h treatment with high (25 mM, HG) or low (5 mM, LG) glucose. Transepithelial short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements through intact (non-permeabilized) CFBE-wt monolayers were performed (see representative trace shown in **Fig. 1A**). We first noted that neither the basal  $I_{sc}$  current nor the transepithelial resistance were significantly decreased by HG exposure (**Fig. 1B**). However, cAMP-activated  $I_{sc}$  (following application of forskolin and IBMX,  $\Delta I_{Fk+IBMX}$ ) were significantly lower under HG than under LG conditions (**Fig. 1C**). A slight decrease in CFTR<sub>Inh172</sub>-sensitive currents ( $\Delta I_{CFTRinh172}$ ) was also measured in the presence of high glucose (**Fig. 1D**). The effect of HG on CFTR  $Cl^-$  currents was not evaluated in CFBE- $\Delta F508$  monolayers, which do not express functional CFTR channels.

We then assessed UTP-activated currents ( $\Delta I_{UTP}$ ), probably mediated by calcium-activated  $Cl^-$  channels (CaCC), in both CFBE- $\Delta F508$  and CFBE-wt monolayers (see representative trace in **Fig. 1E**). Although UTP-activated currents through CFBE-wt monolayers were higher than through CFBE- $\Delta F508$  monolayers (**Fig. 1F**), we noted that these currents were not affected by HG treatments (**Fig. 1F**).

Several lines of evidence indicate that  $K^+$  channel function is critical to maintain  $Cl^-$  transport through the airway epithelia (41;42). We thus decided to compare airway  $K^+$  channel function under normal and hyperglycemic conditions. To specifically measure  $K^+$  currents through the basolateral membrane, the apical membrane was permeabilized with amphotericin B and an apical-to-basolateral  $K^+$  gradient was established (see a representative trace at **Fig. 2A**). Total basolateral  $K^+$  currents (measured after permeabilization with Ampho B,  $\Delta I_{AmphoB}$ ) were reversed by clofilium (inhibiting Kv channels such as KvLQT1) and glibenclamide (inhibitor of  $K_{ATP}$  channels) (**Fig. 2B**). As we previously reported in other non-CF (NuLi) and CF (CuFi) airway cell models (29), total  $K^+$  currents ( $\Delta I_{AmphoB}$ ) and  $\Delta I_{clofi+glib}$  through non-CF (CFBE-wt) monolayers were higher than in CF CFBE- $\Delta F508$  monolayers (**Fig. 2B**, CFBE-wt vs. CFBE- $\Delta F508$ ). We also observed that HG treatments reduced total  $K^+$  currents (by 21%), as well as  $\Delta I_{clofi+glib}$ , in CFBE-wt cells, to reach current levels similar to those measured in CFBE- $\Delta F508$  (**Fig. 2B**). We observed that 24-h HG exposure in the CFBE- $\Delta F508$  did not

further reduce total  $K^+$  currents (**Fig. 2B**). However, after a prolonged treatment (48h), these currents had significantly decreased (by 29%) under HG conditions (Fig. **2C**).

We previously demonstrated that ion transport through CFTR (32) and  $K^+$  channels (28;29) plays a crucial role in airway epithelial repair. Moreover, hyperglycemia has been associated with delayed epithelial wound closure (33;35). In order to evaluate the impact of hyperglycemia on non-CF and CF airway epithelial repair, we employed a well-established wound-healing assay after mechanical injury. First, we confirmed that the wound-healing rates in CFBE- $\Delta$ F508 were lower compared to CFBE-wt monolayers (**Fig. 3**, CFBE-wt vs. CFBE- $\Delta$ F508), as previously shown (29;32). Notably, the presence of 20 mM mannitol (used to mimic the change in osmotic pressure for low glucose conditions) did not affect the repair capacity compared to a low glucose medium without mannitol, even for a 7 day-period (**Fig. 3B**). We then observed that a 24h exposure to HG induced a significant decrease in wound repair rates in CFBE-wt monolayers compared to the LG control. A slight, but significant decrease in wound-healing rates was also observed in the CFBE- $\Delta$ F508 cell monolayers under HG conditions (**Fig. 3C**). Extended exposure to HG (48h, **Fig. 3D** or 7 days, **Fig. 3E**) had a significant negative effect on the wound-healing capacity of CFBE-wt and CFBE- $\Delta$ F508 cell monolayers ( $P<0.02$ ).

Our data previously showed that CFTR rescue with the CFTR corrector VRT-325 in CFBE- $\Delta$ F508 and primary human CF airway cell monolayers significantly improved the wound-healing rates (32). Notably, this improvement seems specific to CFTR and did not induced enhancement in  $K^+$  current ( $12.7 \pm 1.3 \mu A/cm^2$  vs  $10.1 \pm 1.2 \mu A/cm^2$ , in control and VRT-325 conditions). We then investigated if this strategy with CFTR rescue would be still effective under hyperglycemic conditions. We first observed that benefits on CFBE- $\Delta$ F508 repair rates following VRT-325 treatment under LG conditions was not maintained after HG exposure (**Fig. 4A**). Control Ussing experiments indicated that this loss of wound repair capacity is probably not a consequence of impaired CFTR rescue in the presence of HG (Fig. **4B**). In primary human CF airway epithelial cell monolayers, we showed a significant improvement of wound-healing rates after correction with VRT-325 under HG conditions; however, these rates remain significantly lower than in the presence of VRT-325 under LG conditions (**Fig. 4C**).

#### 4. DISCUSSION

Our data demonstrates that high glucose exposure reduces transepithelial  $\text{Cl}^-$  currents mediated by CFTR as well as basolateral  $\text{K}^+$  currents through airway CFBE-wt cells. We also showed that the wound-healing rates of CFBE-wt and CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers were altered under HG conditions. More importantly, our results indicate that hyperglycemia affects the repair rates of CFBE- $\Delta\text{F508}$  and primary human CF airway cell monolayers corrected with VRT-325.

Our Ussing chamber experiments showed that cAMP-activated and CFTR<sub>Inh172</sub>-sensitive short-circuit transepithelial currents through CFBE-wt cells were reduced after a 24h exposure to HG, indicating that CFTR mediated  $\text{Cl}^-$  secretion may be affected by hyperglycemia. In contrast, the UTP-stimulated peaks were similar under LG and HG conditions. However, we observed that the UTP-stimulated current mediated by calcium-activated  $\text{Cl}^-$  (CaCC) channels was smaller in the CFBE- $\Delta\text{F508}$  than in the CFBE-wt cells. This observation is in agreement with previous reports showing reduced activity of the CaCC anoctamin 1 (ANO1) channel (30) and ATP-stimulated currents (43) in CF cells. Similarly, we measured smaller  $\text{K}^+$  currents in the CFBE- $\Delta\text{F508}$  cells than in the CFBE-wt, as we previously reported in other non-CF and CF cell models (NuLi-1 and CuFi-1 cells, respectively) (29). We found that the  $\text{K}^+$  currents through the CFBE- $\Delta\text{F508}$  cells were not further decreased by a 24h hyperglycemic treatment. A longer exposure (48h) was required to significantly affect  $\text{K}^+$  currents in CFBE- $\Delta\text{F508}$  cells. Our data also demonstrates that total basolateral  $\text{K}^+$  currents through CFBE-wt cells were lower after a 24h exposure to HG (compared to LG). Because clofilium- and glibenclamide-sensitive currents were also reduced, we postulated that Kv (probably KvLQT1) and  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels may be affected by HG exposure. In line with these observations, it was previously reported that  $\text{K}_{\text{ATP}}$  currents and Kir6.2 surface expression in  $\beta$ -pancreatic cells were higher under LG conditions than after pretreatment with 11 mM glucose (22). Down-regulation of BKCa channels expressed in HEK293 cells has also been observed after exposure to high (22-25mM) glucose levels (23;24). Conversely, Kv2.1 expression and Kv currents were enhanced after prolonged treatment with 28 mM glucose of pancreatic  $\beta$ -cells (25). In dogs, diabetes induction leads to reduced cardiac transient outward ( $\text{I}_{\text{to}}$ ) and slow delayed rectifier (IKs)  $\text{K}^+$  currents as well as decreased Kv4.3 and MinK (KCNE1) expression,

whereas Kv1.4 and KvLQT1 expression is increased (36). Thus, it appears that hyperglycemia may elicit channel subtype and tissue dependent effects on  $K^+$  channels and the mechanisms whereby high glucose regulates  $K^+$  currents remain to be defined. These modulations in  $K^+$  channel activity may have secondary impacts on the transport of other ions. In epithelial tissues, for example,  $K^+$  channel function is crucial to maintaining membrane potential and electrochemical gradients necessary for  $Cl^-$  secretion. In airway cells, it has been shown that pharmacological modulation of  $K^+$  channels strongly impacted  $Cl^-$  transport (44-46). It could thus be proposed that the inhibition of basolateral  $K^+$  currents under HG conditions observed in our study may play a role in decreasing CFTR currents. However, we cannot exclude the involvement of other mechanisms.

As we had previously reported in several cell models (29;32), our wound-healing assays confirmed a delayed wound repair in CFBE- $\Delta$ F508 cell monolayers compared to non-CF (CFBE-wt) under normal low glucose conditions. A 24h, 48h and 7 days exposure to HG then induced a significant decrease in both CFBE-wt and CFBE- $\Delta$ F508 wound repair. Delayed wound closure in the presence of high glucose levels has also been observed in other models. In porcine corneal epithelial cells cultured in the presence of high glucose (33) and cornea from diabetic rats (34), delayed wound closure has been associated with impaired EGFR/PI3K/AKT signaling pathways, whereas impaired skin healing was accompanied by a reduction in IGF-1 levels in diabetic pigs (47). In contrast, increased vascular smooth muscle cell proliferation and migration, controlled by  $\beta$ 3-integrin signaling, has been reported under hyperglycemic conditions (48). Thus, the regulation of repair processes following changes in glucose levels may be mediated by multiple pathways/responses, including changes in growth factor release, growth factor receptor activation, integrin expression and downstream signaling pathways. However, it has been established that airway repair mechanisms are also controlled by  $K^+$  and CFTR channels (29;31;32). Thus, it could be postulated that the delay in wound healing of CFBE monolayers observed after HG exposure may be due, at least in part, to reduced CFTR and  $K^+$  currents under hyperglycemic conditions. It has to be noted, however, that in our study wound healing assays were carried out on plastic support whereas Ussing chamber measurements were performed on polarized cultures on permeant filters. This difference in culture conditions may have an impact on repair processes.

Finally, our data confirmed our previous reported (32) that CFTR rescue with the CFTR corrector VRT-325 enhanced the wound-closure rates in CFBE-ΔF508 and primary human CF airway cell monolayers. Here, we demonstrated that HG treatment completely abolished the benefits of the VRT-325 on wound repair in CFBE-ΔF508 cells. However, this effect did not appear to be mediated through a deleterious impact of HG on CFTR rescue, which was not affected as indicated by control Ussing chamber measurements. Our experiments showing reduced K<sup>+</sup> currents through CFBE-ΔF508 cells in the presence of HG suggest that this reduction could be mediating the observed decrease in wound repair. However, other mechanisms cannot be excluded.

We also observed that HG elicited a less deleterious effect in CF primary airway cell monolayers. Nevertheless, the wound-healing rates after treatment with VRT-325 and HG remained lower than in the presence of VRT-325 and LG. To the best of our knowledge, this is the first report on the impact of hyperglycemia on airway epithelial repair of CFTR-rescued CF cells. Moreover, the efficiency of CFTR correctors to improve lung integrity and function has never been compared in CF patients with or without CFRD.

In summary, our results indicate that hyperglycemia impairs both ion transport and epithelial repair function in airway epithelial cells. Down-regulation of these two major functions of airway epithelial cells in diabetic patients may have an impact on lung integrity and function in both non-CF and CF patients. Moreover, hyperglycemia may disrupt the benefits of CFTR correctors on airway repair.



## **5. ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was funded by Cystic Fibrosis Canada (grants to E. Brochiero and Y. Berthiaume, studentship to C. Bilodeau), Université de Montréal (studentship to O. Bardou), Centre de recherche du CHUM (CRCHUM) and the Université de Montreal (scholarship to E. Brochiero). We thank R.J. Bridges (Dept. of Physiology and Biophysics, Rosalind Franklin University, North Chicago, IL, USA) and Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Inc. (CFFT) for providing VRT-325. We thank the Biobank of respiratory tissues of CRCHUM/IRCM of the Respiratory Health Network of FRQ-S. Finally, we acknowledge the editorial work and logistical assistance from the Research Support Office, CRCHUM.

## 6. FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Impact of high glucose exposure on  $\text{Cl}^-$  currents through non-CF and CF CFBE airway cell monolayers.** CFBE-wt and CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for a 24-h period on the basolateral side with low (5 mM glucose + 20 mM mannitol, LG) or high (5 + 20 mM glucose, HG) glucose, prior to short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements in an Ussing chamber. Apical and basolateral sides were then bathed with a normal physiological solution. Basal total  $I_{sc}$  current and transepithelial resistance (TER) were then measured in LG and HG conditions (B, n=8), before application of 10  $\mu\text{M}$  amiloride (to inhibit ENaC currents) and then, forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) and IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) to stimulate cAMP-activated CFTR channels, followed by the CFTR<sub>Inh172</sub> (20  $\mu\text{M}$ , apical, see a representative trace in A). Quantification of the mean  $\Delta I_{Fk+IBMX}$  and  $\Delta I_{CFTRInh172}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) after LG and HG exposure are reported in panels C and D (n=8). E and F. UTP (100  $\mu\text{M}$ , apical) was applied to stimulate calcium-activated  $\text{Cl}^-$  currents (see a representative trace in E, while mean  $\Delta I_{UTP}$  currents are reported in F (n=7). \*:  $P < 0.01$

**Figure 2: Reduction of basolateral  $\text{K}^+$  currents through CFBE airway cell monolayers by hyperglycemia.** CFBE-wt and CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for a 24-h (B) or 48-h (C) period on the basolateral side with low or high glucose, prior to short-circuit current measurements in an Ussing chamber. In these experiments, filters were bathed with asymmetrical physiological media (high  $\text{K}^+$  at the apical side and low  $\text{K}^+$  at the basolateral side, see Materials and Methods). The apical membrane was then permeabilized with 7.5  $\mu\text{M}$  amphotericin B (Ampho B). Upon stabilization of the current, clofilium (100  $\mu\text{M}$ ) and then glibenclamide (100  $\mu\text{M}$ ) were applied at the basolateral side (see representative  $I_{sc}$  trace in A). Total basolateral  $\text{K}^+$  currents after apical membrane permeabilization with amphotericin B ( $\Delta I_{AmphoB}$ , B, C) as well as clofilium- and glibenclamide-sensitive  $\text{K}^+$  currents ( $\Delta I_{clofi+glib}$ , B) were then compared under LG and HG conditions, through CFBE-wt (n=14) and CFBE- $\Delta\text{F508}$  (n=6-7). \*:  $P < 0.04$ .

**Figure 3: Decreased wound-healing rates by hyperglycemia in non-CF and CF CFBE airway cell monolayers.** CFBE-wt and CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers were exposed to a normal culture medium (5 mM glucose, Ctl, B), a culture medium supplemented with

mannitol (20 mM mannitol + 5 mM glucose, LG, **B**, **C**, **D**, **E**) or glucose (25 mM glucose, HG, **B**, **C**, **D**, **E**) for 24 h (**C**, n=12), 48 h (**D**, n=17) or 7 days (**B**, n=8; **E**, n=12) before wounding. The wound-closure rates ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) were monitored over a 6-h period (see representative photographs presented in **A**) and then compared in control and LG conditions (**B**) and in LG and HG conditions (**C**, **D**, **E**). \*:  $P<0.02$ .

**Figure 4: Decreased wound-healing rates by hyperglycemia in rescued CF airway cell monolayers.** CFBE- $\Delta\text{F508}$  (**A**, n=13 ; **B**, n=7) and primary human CF airway (**C**, n=8) epithelial cell monolayers were exposed to culture medium containing low or high glucose, in the absence or presence of the CFTR corrector VRT-325 (5  $\mu\text{M}$ ) for 24 h before wounding and/or using chamber measurements. The wound-closure rates ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) were then monitored over a 6-h period. \*:  $P<0.03$ . For *I<sub>sc</sub>* measurements, a  $\text{Cl}^-$  gradient was established by bathing the cell monolayers with an asymmetrical physiological solution (low  $\text{Cl}^-$  concentration solution at the apical side and high  $\text{Cl}^-$  concentration at the basolateral side) and the basolateral membrane was permeabilized with 7.5 $\mu\text{M}$  amphotericin B. Cells were then sequentially exposed to a combination of forskolin (10  $\mu\text{M}$ , Fk), IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) and genistein (30  $\mu\text{M}$ , Gen), followed by CFTR<sub>Inh-172</sub> (20  $\mu\text{M}$ ). The mean  $\Delta I_{\text{Fk+IBMX+Gen}}$  and  $\Delta I_{\text{CFTRInh172}}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) were measured in LG, LG + VRT-325 and HG + VRT-325 conditions (**B**).

## 7. Reference List

- (1) Moran A, Becker D, Casella SJ, Gottlieb PA, Kirkman MS, Marshall BC, et al. Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis-related diabetes: a technical review. *Diabetes Care* 2010 Dec;33(12):2677-83.
- (2) Noronha RM, Calliari LE, Damaceno N, Muramatu LH, Monte O. Update on diagnosis and monitoring of cystic fibrosis-related diabetes mellitus (CFRD). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011 Nov;55(8):613-21.
- (3) Koch C, Rainisio M, Madessani U, Harms HK, Hodson ME, Mastella G, et al. Presence of cystic fibrosis-related diabetes mellitus is tightly linked to poor lung function in patients with cystic fibrosis: data from the European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2001 Nov;32(5):343-50.
- (4) Heianza Y, Arase Y, Tsuji H, Saito K, Amakawa K, Hsieh SD, et al. Low Lung Function and Risk of Type 2 Diabetes in Japanese Men: The Toranomon Hospital Health Management Center Study 9 (TOPICS 9). *Mayo Clin Proc* 2012 Sep;87(9):853-61.
- (5) Ziegler B, Oliveira CL, Rovedder PM, Schuh SJ, Abreu E Silva FA, Dalcin PT. Glucose intolerance in patients with cystic fibrosis: sex-based differences in clinical score, pulmonary function, radiograph score, and 6-minute walk test. *Respir Care* 2011 Mar;56(3):290-7.
- (6) Kerem E, Viviani L, Zolin A, MacNeill S, Hatziagorou E, Ellemunter H, et al. Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS Patient Registry. *Eur Respir J* 2014 Jan;43(1):125-33.
- (7) Meo SA. Significance of spirometry in diabetic patients. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2009;2:47-50.
- (8) Baker EH, Clark N, Brennan AL, Fisher DA, Gyi KM, Hodson ME, et al. Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis. *J Appl Physiol* 2007 May;102(5):1969-75.
- (9) Brennan AL, Gyi KM, Wood DM, Johnson J, Holliman R, Baines DL, et al. Airway glucose concentrations and effect on growth of respiratory pathogens in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2007 Apr;6(2):101-9.
- (10) Philips BJ, Meguer JX, Redman J, Baker EH. Factors determining the appearance of glucose in upper and lower respiratory tract secretions. *Intensive Care Med* 2003 Dec;29(12):2204-10.

- (11) Philips BJ, Redman J, Brennan A, Wood D, Holliman R, Baines D, et al. Glucose in bronchial aspirates increases the risk of respiratory MRSA in intubated patients. *Thorax* 2005 Sep;60(9):761-4.
- (12) Jarad NA, Giles K. Risk factors for increased need for intravenous antibiotics for pulmonary exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. *Chron Respir Dis* 2008;5(1):29-33.
- (13) Parkins MD, Rendall JC, Elborn JS. Incidence and risk factors for pulmonary exacerbation treatment failures in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 2012 Feb;141(2):485-93.
- (14) Sequeiros IM, Jarad N. Factors associated with a shorter time until the next pulmonary exacerbation in adult patients with cystic fibrosis. *Chron Respir Dis* 2012 Feb;9(1):9-16.
- (15) Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, Berthiaume Y, Poitout V, Prentki M, et al. Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev* 2009 Nov;30(4):153-77.
- (16) Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondon M, Charry L, et al. Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med* 2010;10:38.
- (17) Brennan AL, Geddes DM, Gyi KM, Baker EH. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* 2004 Dec;3(4):209-22.
- (18) Widger J, Ranganathan S, Robinson PJ. Progression of structural lung disease on CT scans in children with cystic fibrosis related diabetes. *J Cyst Fibros* 2013 May;12(3):216-21.
- (19) Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* 2003 Jan;445(4):495-8.
- (20) Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:174306.
- (21) Bardou O, Trinh NT, Brochiero E. Molecular diversity and function of K<sup>+</sup> channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009 Feb;296(2):L145-L155.
- (22) Lim A, Park SH, Sohn JW, Jeon JH, Park JH, Song DK, et al. Glucose deprivation regulates KATP channel trafficking via AMP-activated protein kinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2009 Dec;58(12):2813-9.

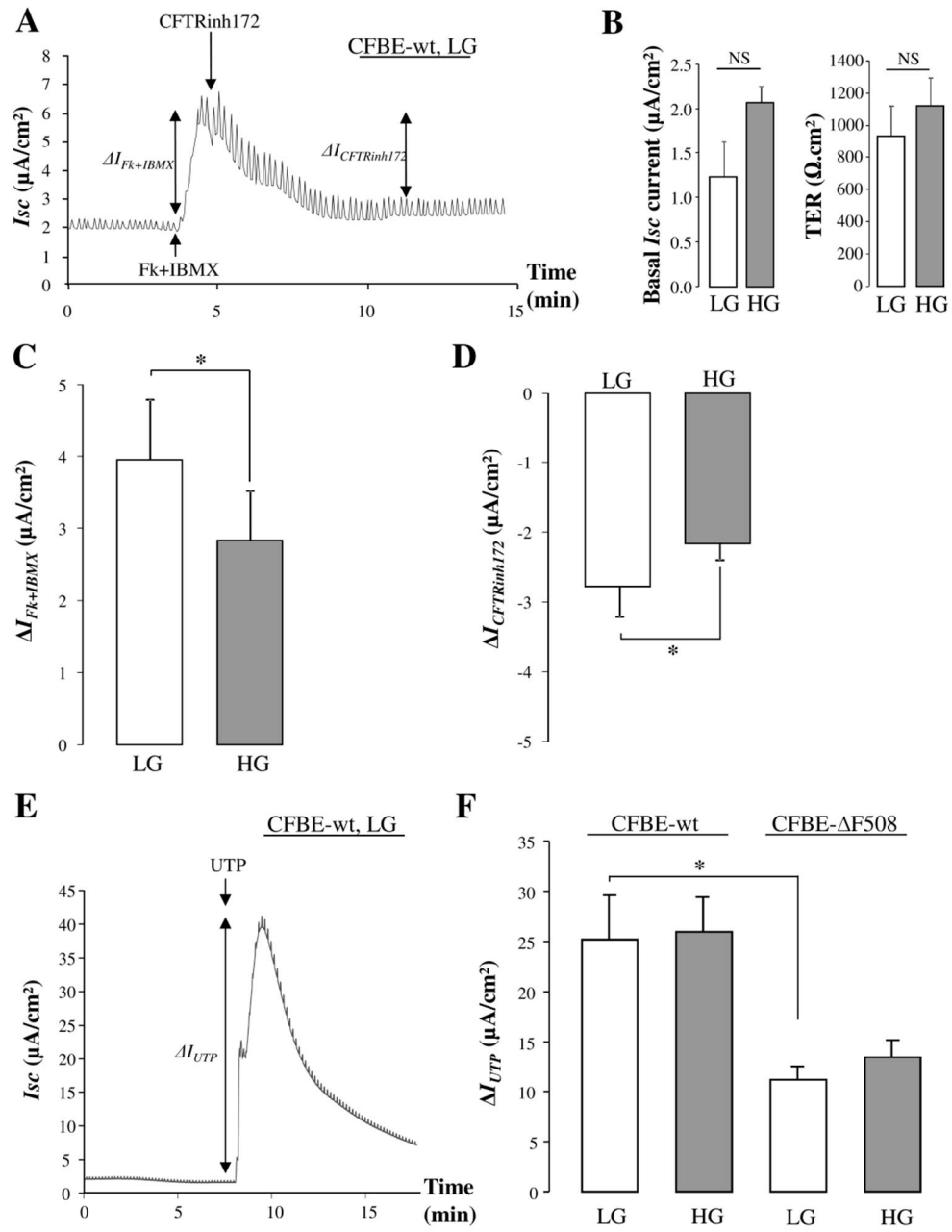
- (23) Chang H, Ma YG, Wang YY, Song Z, Li Q, Yang N, et al. High glucose alters apoptosis and proliferation in HEK293 cells by inhibition of cloned BK Ca channel. *J Cell Physiol* 2011 Jun;226(6):1660-75.
- (24) Lu T, He T, Katusic ZS, Lee HC. Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by high glucose. *Circ Res* 2006 Sep 15;99(6):607-16.
- (25) Chu KY, Cheng Q, Chen C, Au LS, Seto SW, Tuo Y, et al. Angiotensin II exerts glucose-dependent effects on Kv currents in mouse pancreatic beta-cells via angiotensin II type 2 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010 Feb;298(2):C313-C323.
- (26) Girault A, Brochiero E. Evidence of K<sup>+</sup> channel function in epithelial cell migration, proliferation and repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;306:C307-C319.
- (27) Girault A, Prive A, Trinh NT, Bardou O, Ferraro P, Joubert P, et al. Identification of KvLQT1 K<sup>+</sup> channels as new regulators of non-small cell lung cancer cell proliferation and migration. *Int J Oncol* 2014 Mar;44(3):838-48.
- (28) Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, et al. Involvement of KATP and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007 Jul 13;293:L870-L882.
- (29) Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 Nov;295(5):L866-L880.
- (30) Ruffin M, Volland M, Marie S, Bonora M, Blanchard E, Blouquit-Laye S, et al. Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013 Sep 27.
- (31) Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010 Nov;299(5):C912-C921.
- (32) Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maille E, Adam D, Lingée S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* 2012 Dec;40:1390-400.
- (33) Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, Yu FS. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes* 2009 May;58(5):1077-85.
- (34) Xu K, Yu FS. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011 May;52(6):3301-8.

- (35) Lan CC, Wu CS, Kuo HY, Huang SM, Chen GS. Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes. *Br J Dermatol* 2009 Jun;160(6):1206-14.
- (36) Lengyel C, Virag L, Biro T, Jost N, Magyar J, Biliczki P, et al. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res* 2007 Feb 1;73(3):512-20.
- (37) Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993 May;8(5):522-9.
- (38) Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, et al. Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *J Physiol* 2005 Dec 1;569(Pt 2):601-15.
- (39) Maille E, Trinh NT, Prive A, Bilodeau C, Bissonnette E, Grandvaux N, et al. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011 Dec;301(6):L945-L955.
- (40) Klein H, Garneau L, Trinh NT, Prive A, Dionne F, Goupil E, et al. Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009 Feb;296(2):C285-C295.
- (41) MacVinish LJ, Hickman ME, Mufti DA, Durrington HJ, Cuthbert AW. Importance of basolateral K<sup>+</sup> conductance in maintaining Cl<sup>-</sup> secretion in murine nasal and colonic epithelia. *J Physiol* 1998 Jul 1;510 ( Pt 1):237-47.
- (42) Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, et al. Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> secretion by basolateral K<sup>+</sup> channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res* 2003 Apr;53(4):608-18.
- (43) Blouquit S, Regnier A, Dannhoffer L, Fermanian C, Naline E, Boucher R, et al. Ion and fluid transport properties of small airways in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 Aug 1;174(3):299-305.
- (44) Devor DC, Bridges RJ, Pilewski JM. Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 Aug;279(2):C461-C479.
- (45) Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, et al. Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000 Sep;23(3):283-9.
- (46) Cowley EA, Linsdell P. Characterization of basolateral K<sup>+</sup> channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol* 2002 Feb 1;538(Pt 3):747-57.

- (47) Velandar P, Theopold C, Hirsch T, Bleiziffer O, Zuhaili B, Fossum M, et al. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen* 2008 Mar;16(2):288-93.
- (48) Panchatcharam M, Miriyala S, Yang F, Leitges M, Chrzanowska-Wodnicka M, Quilliam LA, et al. Enhanced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in response to vascular injury under hyperglycemic conditions is controlled by beta3 integrin signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 Jun;42(6):965-74.

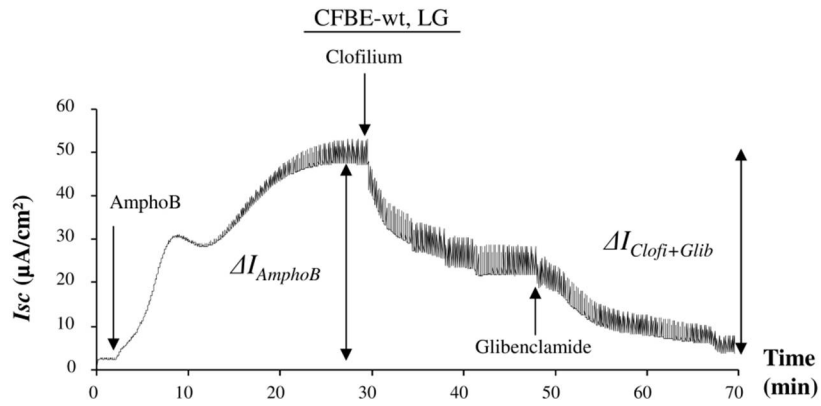


**Figure 1.**

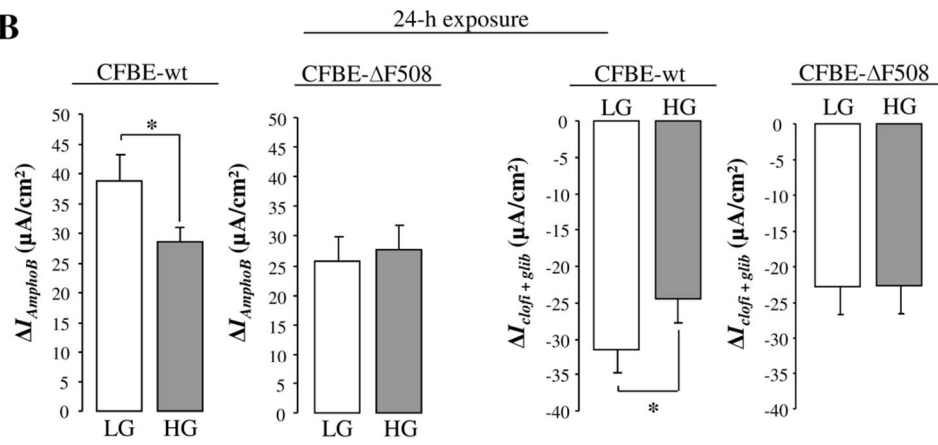


**Figure 2.**

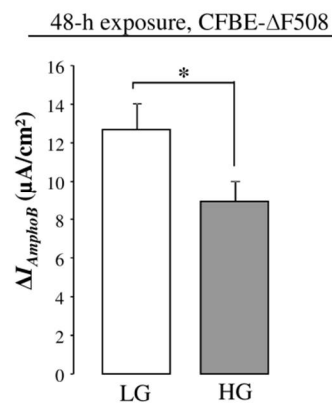
**A**



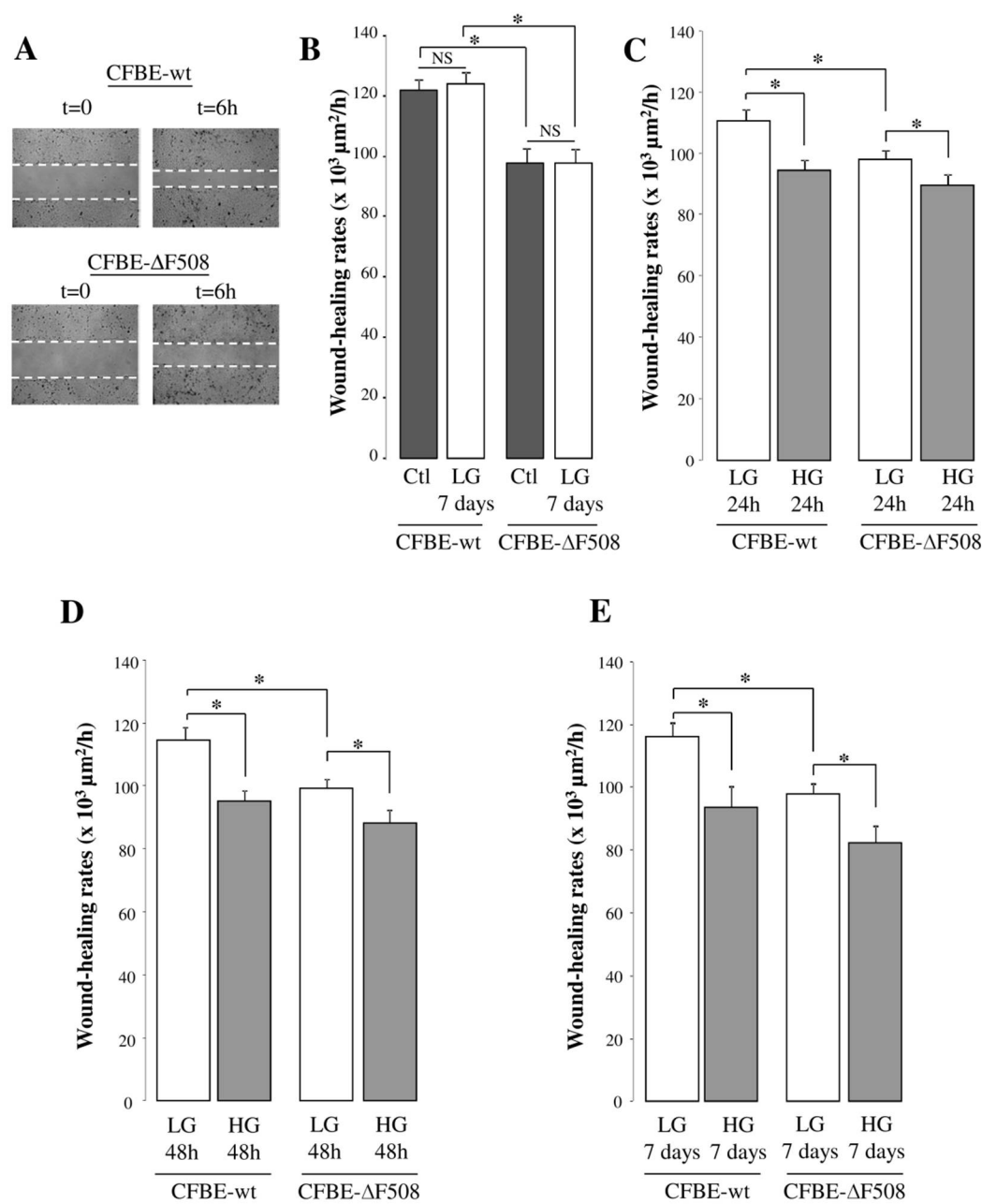
**B**



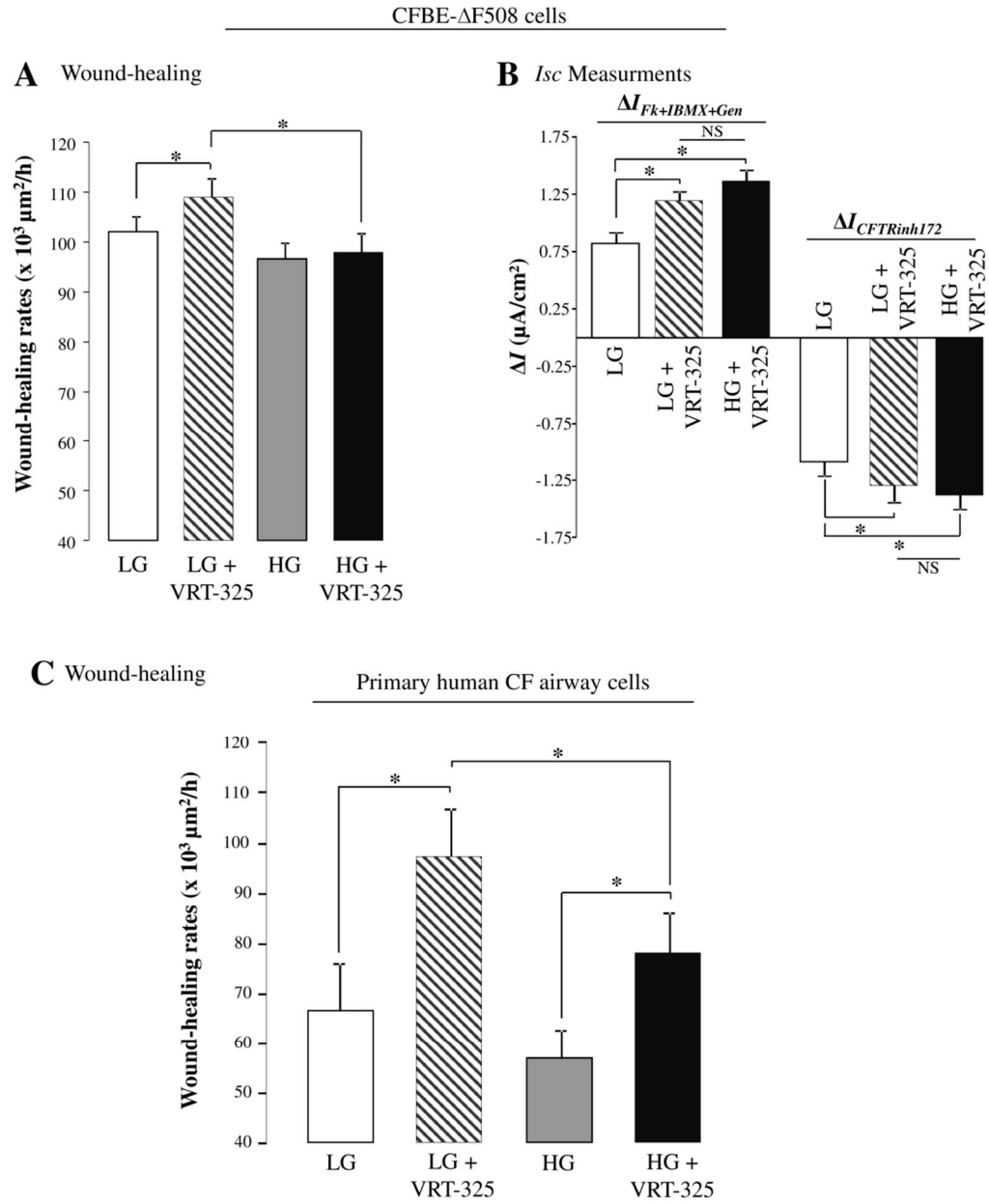
**C**



**Figure 3.**



**Figure 4.**



## **3.2 Article 2 : Deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and rescue in airway epithelial cells.**

### **3.2.1 Résumé**

Le CFTR joue un rôle crucial dans le maintien de l'ASL et cette fonction de l'épithélium pourrait être compromise chez les patients non-FK infectés par *P. aeruginosa*. Chez les patients FK, la clairance mucociliaire déficiente, causée entre autres par la réduction de CFTR fonctionnel, rend l'environnement des voies aériennes favorables à l'infection chronique par cette bactérie, qui représente la bactérie opportuniste la plus répandue chez les patients FK adultes. Nous avons donc pensé qu'il était crucial de déterminer l'impact de l'infection à *P. aeruginosa* sur la correction de CFTR, afin de vérifier la réelle efficacité des molécules correctrices en condition infectieuse. Nous avons donc investigué l'effet des exoproduits de *P. aeruginosa* (PsaDM) sur l'expression du CFTR et la fonction de celui-ci dans les cellules non-FK, FK et FK corrigées.

Nos résultats ont montré que l'exposition au PsaDM diminue la fonction et l'expression du CFTR-WT dans les cellules des voies aériennes non-FK. Des expériences complémentaires nous permettent de croire qu'une partie de la diminution de l'expression est causée par une augmentation de la dégradation ainsi qu'une réduction de la synthèse de CFTR. Finalement, nos résultats sur les cellules FK CFTR-F508del mettent en lumière un impact délétère du PsaDM sur la correction de la fonction du canal par le VRT-325.

Nos résultats démontrent l'importance de déterminer quels facteurs sont responsables de cet effet délétère afin de tenter de les contrer et également d'identifier de nouvelles molécules qui seront efficaces malgré la présence d'infection à *P. aeruginosa*.

### **3.2.2 Contribution**

À mon arrivée à la maîtrise, des résultats préliminaires sur l'impact de l'infection sur CFTR avaient été obtenus par l'étudiante au doctorat, Nguyen Thu Ngan Trinh. Nous avons poursuivi ensemble les expérimentations, développé les approches expérimentales, analysé et

interprété les résultats conjointement sous la supervision du Dre. Brochiero. Lorsque Thu Ngan a complété son doctorat, j'ai été responsable des expériences demandées par les évaluateurs avant publication dans le journal Eur Respr J. Compte tenu de notre implication, Thu Ngan et moi sommes co-premières auteures de cet article. Dre. Manon Ruffin (post doctorante au laboratoire) et Émilie Maillé (assistante au laboratoire) ont permis, par leur expertise, la réalisation des expériences d'immunofluorescences. Dr. Simon Rousseau nous a aussi fourni de judicieux conseils pour les expériences de biosynthèses et de dégradations du CFTR. La version publiée de l'article est jointe en annexe 2.

# **Deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR function in airway epithelial cells**

NGUYEN THU NGAN TRINH<sup>1,2\*</sup>, CLAUDIA BILODEAU<sup>1,2\*</sup>, ÉMILIE MAILLÉ<sup>1</sup>, MANON RUFFIN<sup>1,2</sup>, MARIE-CLAUDE QUINTAL<sup>3</sup>, MARTIN-YVON DESROSIERS<sup>1</sup>, SIMON ROUSSEAU<sup>4</sup> AND EMMANUELLE BROCHIERO<sup>1,2</sup>

\*NTN Trinh and C Bilodeau equally contributed to that study.

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),

<sup>2</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,

<sup>3</sup>CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup>Meakins-Christie Laboratories, Department of Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author (and reprint request):

Emmanuelle Brochiero, Ph.D.

CRCHUM, Tour Viger

900 rue St-Denis

Montréal, Québec, Canada H2X09A

## ABSTRACT

The epithelial response to bacterial airway infection, a common feature of lung diseases such as COPD and cystic fibrosis (CF), has been extensively studied. However, its impact on CFTR channel function is not clearly defined. Our aims were therefore to evaluate the effect of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR function and expression in non-CF airway epithelial cells, and to investigate its impact on  $\Delta F508$ -CFTR rescue by the VRT-325 corrector in CF cells.

CFTR expression/maturation was evaluated by immunoblotting and its function by short-circuit current measurements. A 24-h exposure to *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM) reduced CFTR currents as well as total and membrane protein expression of the wt-CFTR protein in CFBE-wt cells. In CFBE- $\Delta F508$  cells, PsaDM severely reduced CFTR maturation and current rescue induced by VRT-325. We also confirmed a deleterious impact of PsaDM on wt-CFTR currents in non-CF primary airway cells as well as on the rescue of  $\Delta F508$ -CFTR function induced by VRT-325 in primary CF cells.

These findings show that CFTR function could be impaired in non-CF patients infected by *P. aeruginosa*. Our data also suggest that CFTR corrector efficiency may be affected by infectious components, which should be taken into account in screening assays of correctors.

**KEYWORDS:** airways, CFTR channel, CFTR corrector, expression, function, currents, infection

**HIGHLIGHTS:** Exposure of airway epithelial cell to *Pseudomonas aeruginosa* impairs CFTR function, expression and rescue by correctors.



## INTRODUCTION

Chloride and bicarbonate secretion through cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channels is crucial in airways to maintain an adequate periciliary liquid volume and an efficient mucociliary clearance [1], as well as to control airway surface liquid pH [2], which are necessary to protect the lung against infections. Despite these mechanisms of defence, lungs are frequently exposed to infection/inflammation, which are common features of several lung pathologies including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cystic fibrosis (CF). The impact of infection on airway epithelia has been extensively studied and it has been established that the continuous presence of pathogens is associated with oxidative stress and chronic inflammatory responses [3-5]. However, the consequences of exposure to infections on CFTR channel expression and function have not been clearly defined. In fact, contradictory results have been reported depending on the bacterial strain, the duration of exposure to infection, as well as the cellular models tested [6-9]. However, it is crucial to understand the outcomes of microbial infection on CFTR. Indeed, a decrease of CFTR function in airways of infected patients would further reduce defence against infections, thus creating a vicious circle of infections impairing CFTR, and then dysfunctional CFTR favouring infections.

In cystic fibrosis, due to mutations in the *CFTR* gene, dysfunctional CFTR is associated with reduced periciliary volume and mucus accumulation, favouring bacterial colonization and chronic inflammation [5;10]. The prevalence of respiratory pathogens in CF patients varies as a function of age, but the most frequently found bacteria in adults are *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), which gradually colonize CF airways [11]. Many of the current therapies in CF are thus directed against infection as well as towards attenuating the inflammatory response [12;13]. In addition, many efforts have recently been put towards the development of new strategies directly targeting the basic CFTR defects rather than CF symptoms [14;15]. New therapies, adapted to each specific class of mutations, are thus progressively emerging. Among them, small molecules called correctors are directed against class II mutations, including the most frequent mutation in CF patients, a deletion of F508 ( $\Delta$ F508-CFTR) leading to improper folding, ER trapping and protein degradation [14;15]. Efficient CFTR maturation and delivery to the cell membrane has been reported after

treatment with various corrector molecules, including corr-2b, corr-4a, VRT-325, MPB-07, KM1160, C18 and VX-809 [16-25]. However, to the best of our knowledge most high throughput screening assays to identify efficient corrector molecules are performed in the absence of infectious products. Notably, it has been previously reported that *P. aeruginosa* exposure reduced CFTR rescue induced by low temperature [6]. Because microbial infection is a key component of CF lung disease, it would thus be crucial to assess the efficiency of small molecules targeting CFTR defects in the presence of infection.

The aim of this study was first to evaluate the impact of *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM) on CFTR function and expression in non-CF airway epithelial cells. We then assessed the effect of PsaDM on CFTR protein degradation and synthesis as well as membrane expression. Finally, we tested if *P. aeruginosa* exoproducts could affect  $\Delta F508$ -CFTR maturation and functional rescue by the CFTR corrector VRT-325 in CF airway epithelial cells.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture*

CFBE- $\Delta$ F508 and CFBE-wt cell lines (CFBE41o- parental cells [26] stably transduced, respectively, with  $\Delta$ F508-CFTR and with wt-CFTR [27]) were used initially. Primary human airway cells were isolated from tissues obtained from non-CF and CF patients (with class II mutations, including  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 and  $\Delta$ F508/N1303K, median age 23 yrs, mean FEV<sub>1</sub> of 82  $\pm$  9%) undergoing nasal polypectomy at CHUM and CHU Ste-Justine hospitals (Montréal, QC, Canada) [28], according to approved ethical protocols. Written informed consents have been obtained from all participants. Cell isolation and culture conditions are detailed in the online supplementary material.

### *Preparation of P.aeruginosa diffusible material (PsaDM)*

Briefly, *P.aeruginosa* mucoid strain PACF508 was isolated from the sputum of a CF patient ( $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508, CHU Ste-Justine Hospital, Montréal) and was grown in lysogeny broth medium (LB, Life Technologies) for 72h (corresponding to the late stationary phase) [29] at 37°C with shaking at 250 RPM. The bacterial culture was then centrifuged and the supernatant was filtered successively through 0.8 $\mu$ m-, 0.45 $\mu$ m- and 0.2 $\mu$ m filters. LB was used as the control condition.

### *Immunoblotting*

Total proteins were extracted from CFBE cells treated or not with VRT-325 (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutic Inc., CFFT), LB, PsaDM, cycloheximide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and/or with MG132 (Abmole Bioscience, Kowloon, Honk Hong). For CFTR [28] and EGFR [30] detection, the upper section of the membrane was incubated with the polyclonal anti-CFTR 596 antibody (CFFT) or anti-EGFR antibody (anti-erbB1, Cell Signaling Technology, Danvers, MA); whereas the bottom section was incubated with purified mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Cedarlane Laboratory, Burlington, ON, Canada) to ensure equivalent loading. The expression of CFTR was reported as percentage relative to cells with LB, after normalization to  $\beta$ -actin signal.

### ***Biotinylation and pull-down***

CFBE-wt cells, treated with LB or PsaDM, were exposed to sulfo-NHS-SS-biotin before protein solubilisation in RIPA. Protein were then absorbed on streptavidin beads, transferred onto a Pierce spin column, and then eluted with a 2X sample buffer, before separation on SDS-Page and CFTR detection by immunoblotting.

### ***Immunofluorescence assay***

CFTR proteins were detected by immunofluorescence assay on CFBE cells, seeded on Lab-Tek chamber slides (Thermo-Fisher) and treated with LB or PsaDM before incubation with anti-CFTR 596 antibody (CFFT) and then Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse antibody (Life Technologies Inc.). Slides were finally counterstained with To-Pro-3 iodide (Life Technologies) and fluorescent images were captured by a Confocal Leica TCS\_SP5 microscope (see supplementary methods for details).

### ***Electrophysiology***

Short-circuit currents ( $I_{sc}$ ) [30-32] were measured through CFBE and primary airway cells [28] that had been cultured on coated permeant filters until they reached an air-liquid interface and formed a polarized epithelium with high resistance [33;34]. Measurements were performed (see supplementary material for details) on intact monolayers or through apical membranes after permeabilization of the basolateral side with 7.5  $\mu$ M amphotericin B (Sigma-Aldrich), in the presence of a symmetrical physiological solution or a Cl<sup>-</sup> gradient, as indicated in figure legends.

### ***CFTR mRNA expression***

Total RNA from CFBE cells treated with PsaDM or LB was purified with TRIzol reagent (Life Technologies) [28] and CFTR mRNA expression was evaluated by qPCR as described in supplementary material. The expression of CFTR was reported as percentage relative to cells treated with LB.

### ***Statistics***

The data are presented as means  $\pm$  SE. Groups were compared by paired *t*-test or non-parametric Wilcoxon test, with Statview (SAS Institute, Cary, NC, USA) and GraphPad (La Jolla, CA, USA) software, respectively. A probability of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

## RESULTS

### *Decrease in CFTR function induced by P.aeruginosa exoproducts*

We first evaluated the impact of *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM) on CFTR function in polarized airway epithelial CFBE-wt cell monolayers grown on permeant filters. Cells were treated with either LB (control) or PsaDM for a 24-h period before short-circuit current measurements. Just before mounting in an Ussing chamber, intact cell monolayers were washed and bathed with a symmetrical physiological solution supplemented with amiloride in order to inhibit  $\text{Na}^+$  currents through ENaC channels. Forskolin, IBMX and genistein were then applied at the apical membrane to stimulate cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  secretion through CFTR channels, which was finally inhibited by the CFTR<sub>Inh-172</sub> (**Fig. 1A**). We observed that the change in short-circuit current ( $\Delta I_{\text{short-circuit}}$ ) after CFTR activation/potentialization ( $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX}} + \Delta I_{\text{Genistein}}$ ) was significantly reduced in monolayers treated with PsaDM ( $0.7 \pm 0.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) when compared to the LB control ( $2.0 \pm 0.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0.02$ , **Figs. 1A**). Similarly, CFTR<sub>Inh-172</sub>-sensitive CFTR current ( $\Delta I_{\text{CFTRInh-172}}$ ) was also markedly affected by exposure to PsaDM ( $-1.2 \pm 0.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  compared to  $-2.8 \pm 0.6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  for LB,  $p < 0.02$ , **Figs. 1A**).

To assess the specific effect of 24-h treatment with PsaDM on  $\text{Cl}^-$  currents through the apical membrane, a series of experiments was performed on CFBE-wt cell monolayers after permeabilization of the basolateral membrane and establishment of a  $\text{Cl}^-$  gradient. Although cAMP-stimulated and CFTR<sub>Inh-172</sub>-sensitive  $\text{Cl}^-$  currents were higher in these conditions (**Fig. 1B**) than through intact monolayers (**Fig. 1A**), a significant reduction was observed in PsaDM treated monolayers (**Fig. 1B**).

We also noted a significant inhibition by PsaDM of UTP-stimulated currents, probably mediated by CaCC channels ( $11.1 \pm 1.9$  and  $5.5 \pm 0.8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , in LB and PsaDM treated CFBE-wt cell monolayers,  $n=6$ ,  $p < 0.04$ ). It has to be noted that exposure to PsaDM did not elicit any decrease in transepithelial resistance ( $1018 \pm 39$  and  $1398 \pm 97 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , respectively in LB and PsaDM conditions).

### *Decrease in CFTR expression induced by P.aeruginosa exoproducts*

We then investigated if the observed decrease in CFTR function induced by *P. aeruginosa* exoproducts in CFBE cells was associated with reduced CFTR expression. We first tested the impact of PsaDM on CFTR mRNA expression in non-CF CFBE-wt cells as well as in CF CFBE-ΔF508 cells. As shown in **Fig. 2A**, the number of CFTR mRNA copies measured by real-time PCR in CFBE-wt cells remains unchanged in the presence of PsaDM. Meanwhile, PsaDM slightly decreased the level of expression of CFTR mRNA in CFBE-ΔF508 ( $p<0.006$ ).

We then assessed the impact of PsaDM on total CFTR protein expression by immunoblotting. As expected, immature and mature CFTR bands (band B and C, respectively) were detected in CFBE-wt cells (**Fig. 2B**, left panel), while the immature band B was visible in lysates from CFBE-ΔF508 cells expressing the ΔF508-CFTR mutant protein (**Fig. 2B**, right panel). It was then observed that the intensity of both bands in CFBE-wt was severely reduced in the presence of PsaDM (by 73% and 40%, respectively,  $p<0.04$ ), when compared to LB control (**Fig. 2B**, left panel). In CFBE-ΔF508 cells, the immature form of CFTR was also affected by PsaDM exposure (57% decrease,  $p<0.0002$ , **Fig. 2B**, right panel). It has to be noted that equal amounts of proteins were loaded in each condition, and signals were normalized to β-actin (which was not altered by PsaDM, see β-actin detection from the same immunoblots, **Fig. 2B**).

The effect of PsaDM on CFTR membrane expression in CFBE-wt cells was finally evaluated. Immunoblotting assays after surface biotinylation revealed that infectious products significantly reduced the level of CFTR plasma membrane expression compared to control (**Fig. 3A**). Complementary confocal immunofluorescence experiments also showed that CFTR membrane localisation observed in CFBE-wt cells in control condition (LB) was dramatically affected after exposure to PsaDM (**Fig. 3B**).

Taken together, these results demonstrated that bacterial exoproducts affected CFTR expression, localisation and function.

### ***Impact of *P.aeruginosa* exoproducts on CFTR protein degradation and synthesis***

In order to define if the observed decrease in total CFTR protein level in the presence of PsaDM could be due to enhanced protein degradation, we blocked protein translation by

exposing CFBE-wt cells to cycloheximide for 0, 2, 8, 18, 24 and 32h, in the presence or absence of PsaDM. We then measured the remaining level of CFTR protein by immunoblotting (normalized to  $\beta$ -actine, and expressed as % of T0 in control condition). As illustrated on **Fig. 4A**, the decrease in CFTR protein abundance following 8h, 18h and 32h cycloheximide (CHX) treatments was slightly, but significantly, higher in the presence of PsaDM ( $p<0.05$ ). However, this potential increase in CFTR degradation after exposure to PsaDM may not be sufficient to explain the large decrease in CFTR protein level shown in **Fig. 2B**. A possible impact of PsaDM on CFTR synthesis was thus assessed by exposing CFBE-wt cells to MG132, a proteasomal inhibitor, for 0, 2, 8 and 18 h, in the presence or absence of PsaDM and then measuring the accumulation of CFTR protein by immunoblotting. We observed (**Fig. 4B**) that the accumulation of wt-CFTR protein bands B and C was higher under control conditions (LB) than in the presence of PsaDM ( $p<0.04$ ), suggesting that *P. aeruginosa* exoproducts could reduce CFTR protein synthesis. To confirm that the huge accumulation of CFTR protein observed after proteasomal inhibition with MG-132 (at 18h, MG132+LB, **Fig. 5A** and **5B**) was secondary to newly synthesised CFTR proteins, we verified that a co-treatment with CHX (MG132+CHX+LB) totally prevented CFTR accumulation. Again, our data showed that CFTR protein accumulation was severely impacted by PsaDM (MG132+PsaDM) compared to MG132+LB condition ( $p<0.05$ ). We also measured the levels of EGFR expression to define if PsaDM could also affect a non-channel membrane protein. Although EGFR accumulation after proteasomal inhibition with MG132 was lower than that of CFTR, we noted that PsaDM exposure did not significantly affected EGFR levels (**Fig. 5C**).

### ***Impaired CFTR rescue in the presence of P.aeruginosa exoproducts***

In the light of this evidence pointing towards a deleterious effect of PsaDM on CFTR function and expression, we then decided to investigate if PsaDM had an impact on the ability of the CFTR corrector VRT-325 to rescue  $\Delta$ F508-CFTR maturation and function in CF cells. As previously reported [28], we first confirmed that VRT-325 partially rescued CFTR mature band C protein expression (**Fig. 6A**, see comparison between LB and LB+VRT-325 lanes) as well as CFTR currents through the apical membrane of CFBE- $\Delta$ F508 cell monolayers (**Fig.**



**6B**, CFBE-ΔF508, LB *versus* CFBE-ΔF508, LB+VRT-325). Indeed, short-circuit current measurements revealed that CFBE-ΔF508 cell monolayers treated for 24h with VRT-325 elicited significantly higher cAMP-activated Cl<sup>-</sup> currents, sensitive to the CFTR<sub>Inh172</sub>, compared to the LB control condition (**Fig. 6B**).

In the presence of PsaDM for 24h (PsaDM+VRT-325), we noted, however, a drastic decrease in band C maturation/expression, compared to the signal in the LB+VRT-325 ( $p<0.02$ , **Fig. 6A**). The outcome of PsaDM on the rescue of ΔF508-CFTR channel function by VRT-325 was then assessed. As shown in **figure 6B**, cAMP-activated Cl<sup>-</sup> secretion following CFTR activation/potentialiation ( $\Delta I_{Fsk+IBMX+Genistein}$ ) was notably decreased in PsaDM+VRT-325 ( $0.66\pm0.68 \mu A/cm^2$ ) when compared to LB+VRT-325 ( $2.16\pm0.32 \mu A/cm^2$ ,  $p<0.03$ ). Furthermore, VRT-325-rescued CFTR<sub>Inh172</sub>-sensitive CFTR currents in the presence of PsaDM (PsaDM+VRT-325,  $-1.74\pm0.58 \mu A/cm^2$ ) were also smaller than in LB (LB+VRT-325,  $-2.89\pm0.47 \mu A/cm^2$ ,  $p<0.02$ , **Fig. 6B**). These results indicated that the rescue of ΔF508-CFTR channel function by the CFTR corrector VRT-325 is strongly impaired by *P. aeruginosa* exoproducts.

### ***Deleterious impact of P. aeruginosa exoproducts on CFTR function in primary human airway epithelial cells***

The effect of PsaDM on CFTR function was finally assessed in primary human airway epithelial cells isolated from non-CF and CF patients. In non-CF airway cells, we confirmed a significant reduction in cAMP-activated Cl<sup>-</sup> secretion ( $\Delta I_{Fsk+IBMX}$  of  $13.9\pm3.5$  vs.  $8.9\pm2.7 \mu A/cm^2$ , respectively under LB and PsaDM conditions,  $p<0.05$ ), as well as CFTR<sub>Inh172</sub>-sensitive ( $\Delta I_{CFTRinh-172}$ ,  $-18.5\pm3.1 \mu A/cm^2$  in LB vs.  $-13.5\pm3.1 \mu A/cm^2$  in PsaDM) CFTR currents by *P. aeruginosa* exoproducts (**Fig 7**). Moreover, the rescue of CFTR currents in CF airway primary cells, induced by VRT-325, was also impaired in the presence of PsaDM ( $\Delta I_{Fsk+IBMX}$  of  $1.1\pm0.4 \mu A/cm^2$  vs.  $0.4\pm0.4 \mu A/cm^2$ , respectively in the presence of LB+VRT-325 or PsaDM+VRT-325,  $p<0.03$ , **Fig. 8**). CFTR<sub>Inh172</sub>-sensitive CFTR currents were also slightly reduced in the presence of PsaDM.

## DISCUSSION

Altogether, our data demonstrated that exoproducts from *P. aeruginosa* impacted CFTR function in both CFBE-wt cells and primary human airway epithelial cells isolated from non-CF patients. A decrease in CFTR protein expression was observed, which could be due, at least in part, to enhanced protein degradation and reduced protein synthesis. *P. aeruginosa* exoproducts also affected CFTR membrane expression. Importantly, our study also revealed that the functional rescue of  $\Delta F508$ -CFTR by a CFTR corrector in CFBE- $\Delta F508$  cells and CF primary human airway epithelial cells was impaired in the presence of bacterial products.

### *Impaired CFTR function by infectious products*

Our Ussing chamber experiments on CFBE-wt cells presented in **Fig. 1** demonstrated that a 24-h exposure to diffusible materials from a clinical isolate of *P. aeruginosa* (PACF508 strain) induced a significant reduction in cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  currents through CFTR channels. We are aware that the observed decrease in cAMP-activated currents after exposure to PsaDM could be due to a secondary effect on other cAMP-dependent channels, such as the basolateral  $\text{KvLQT1 K}^+$  channel. To further define if the effect of PsaDM is specific of CFTR, another series of experiments were undertaken on CFBE-wt cells, after permeabilization of the basolateral membrane and establishment of a  $\text{Cl}^-$  gradient, to focus on  $\text{Cl}^-$  currents through the apical membrane. As presented on **Fig. 1B**, a significant reduction in both cAMP-activated and CFTR<sub>Inh172</sub>-sensitive currents was observed in PsaDM treated CFBE-wt cell monolayers. This result confirmed the impact of *P. aeruginosa* exoproducts on CFTR function. It has to be noted that PsaDM also reduced UTP-activated currents through CaCC channels, thus potentially precluding a possible compensatory effect of the CaCC after inhibition of CFTR channels in infectious conditions.

Similar to our results, Swiatecka-Urban *et al.* [6] previously reported that a 4-6 h period incubation with a culture of a *P. aeruginosa* laboratory isolate (PA14) reduced CFTR-mediated transepithelial  $\text{Cl}^-$  secretion through Calu-3 cells as well as CFBE41o- cells stably expressing wt-CFTR. Importantly, we now confirmed the deleterious impact of a 24-h exposure to *P. aeruginosa* exoproducts in differentiated primary cultures of non-CF human airway cells (**Fig. 7**). In contrast with these data, it has been shown that acute (15 min)

application of *P. aeruginosa* (PA14) or purified LPS increased the rate of iodide efflux, an index of Cl<sup>-</sup> secretion, through 2WT2 epithelial cells expressing wt-CFTR [9]. Furthermore, Buyck *et al.* [35] have shown that *P. aeruginosa* LPS-stimulated Cl<sup>-</sup> currents through CFTR channels in 16HBE14o- cells, probably via a calcium signal. Similarly, N-(3-oxo-dodecanoyl)-S-homoserine lactone (3O-C12), a quorum sensing molecule secreted by *P. aeruginosa*, has been shown to rapidly enhance Cl<sup>-</sup> and fluid secretion as well as cytosolic Ca<sup>2+</sup> and cAMP levels [36]. It has also been reported that *P. aeruginosa* flagellin activated CFTR-dependent anion secretion in Calu-3 (through p38 signalling) as well as in primary cultures of human bronchial epithelial cells [37]. Most of these observations were interpreted as an attempt by airway epithelia to rapidly react to bacterial infection by increasing CFTR-dependent ion and fluid flow necessary for bacterial clearance from the airways. Notably, whereas pyocyanine (N-methyl-1-hydroxyphenazine) slightly activated basal Cl<sup>-</sup> secretion through CFBE-wt cells, this redox-active virulence factor produced by *P. aeruginosa*, severely inhibited forskolin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion [38]. Our results, as well as data from the literature, thus indicated that the effects of *P. aeruginosa* infection may be time- and model-dependent. Moreover, different *P. aeruginosa* products/virulence factors present in PsADM could be responsible for the observed effects, and further studies would be necessary to clearly define their mechanisms of actions.

### ***Impact of infection on CFTR expression***

In order to determine if the decrease in CFTR function after chronic exposure to *P. aeruginosa* products could be due to a decrease in CFTR expression, we then undertook PCR and immunoblot measurements to assess changes in CFTR mRNA and protein expression in CFBE-wt cells. Whereas the level of wt-CFTR mRNA was not affected after a 24 h treatment with PsADM, we observed that both immature (band B) and mature (band C) CFTR proteins were severely reduced in CFBE-wt cells. In contrast with our results, a previous study [6] indicated that live *P. aeruginosa* bacteria (PA14 strain, 4-6 h of infection) had no effect on total cellular expression of wt-CFTR. However, it was shown that PA14 decreased the expression of wt-CFTR at the apical membrane, which is in agreement with the reduced function of CFTR observed under infectious conditions in that study as well as in ours. Moreover, our immunoblot assays after surface biotinylation as well as immunofluorescence

analysis with confocal microscopy (**Fig. 3**) showed reduced CFTR membrane expression after PsaDM exposure.

It has to be noted that PACF508 used in our study is a clinical mucoid strain. However, it seems that the mucoid phenotype of *P. aeruginosa* is not responsible for the deleterious effect on CFTR since the non-mucoid laboratory strains PAO1 and PAO14 has also been shown to downregulate CFTR [6;39]. The study by Rubino *et al* [39] indicated that a mechanism involving bacterial pilin and flagelin as well as cellular NHERF1 could be involved in CFTR regulation by *P. aeruginosa*. In fact, various products secreted by *P. aeruginosa* have also been shown to have an impact on CFTR expression and function. Pyocyanin, for example, was found to inhibit CFTR expression at the apical membrane of airway epithelial cells [40]. The PA2394 protein (called CFTR inhibitory factor, Cif) secreted by *P. aeruginosa* is also involved in the reduction of CFTR apical membrane expression [41]. A model was then proposed where Cif secretion in *P.aeruginosa* outer membrane vesicles may reduce USP10-mediated deubiquitination of CFTR and secondarily increase the degradation of CFTR in lysosomes [42]. In agreement with CFTR degradation induced by infection, our results observed in the presence of cycloheximide presented at **Fig. 4** indicated that the kinetics of wt-CFTR protein degradation could be slightly faster in the presence of PsaDM, compared to control conditions. However, this effect may not be sufficient to explain the huge inhibition of CFTR protein expression induced by PsaDM shown in **Fig. 2**. In fact, our data obtained in the presence of MG132 and/or cycloheximide (**Fig. 4** and **5**) indicated that CFTR synthesis may also be affected by PsaDM. Our study, as well as data from the literature, thus indicated that *P. aeruginosa* exoproducts may impact CFTR protein synthesis, degradation and trafficking/recycling to the cell membrane. A reduction in CFTR protein expression and function in non-CF airways exposed to chronic infection, for example in COPD patients, may have a negative impact on mucociliary clearance and consequently on the ability of airways to clear bacteria. This phenomenon could thus create a vicious circle of infection impairing CFTR, and dysfunctional CFTR favouring infection.

### ***Impaired $\Delta F508$ -CFTR rescue in the presence of infection***

Our immunoblot experiments on CFBE- $\Delta F508$  cells first revealed that the immature band B of  $\Delta F508$ -CFTR was decreased by a 24-h exposure to PsaDM (**Fig. 2B**). Furthermore,

immunoblot and Ussing chamber measurements showed for the first time that *P. aeruginosa* exoproducts severely affected the ability of a CFTR corrector to rescue  $\Delta$ F508-CFTR maturation and function in CFBE- $\Delta$ F508 cells as well as in CF primary airway epithelial cells (**Figs. 6 and 8**). These results are in agreement with a previous study [6] indicating that *P. aeruginosa* PA14 bacteria decreased CFTR currents induced by low temperature rescue in CFBE cells expressing  $\Delta$ F508-CFTR. The mechanisms whereby  $\Delta$ F508-CFTR rescue may be affected by *P. aeruginosa* remain to be elucidated.

Altogether, these data thus indicated that the presence of infection in CF patients may impair the ability of CFTR correctors to rescue the basic CFTR defect. These observations are thus critical to future screenings of CFTR correctors that should take into account the infectious component, in order to select small corrector molecules that could be efficient despite the presence of pathogens.

**SUPPORT STATEMENT**

This study was funded by Cystic Fibrosis Canada (research grant, E Brochiero, studentship, C Bilodeau), CRCHUM and Université de Montréal (E Brochiero, C Bilodeau), the Canadian Thoracic Society, the Fondation GO and the CORAMH (studentships, NTN Trinh).

**STATEMENT OF CONFLICT OF INTEREST**

None declared

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We acknowledge Dr. RJ Bridges (Rosalind Franklin University) and CFFT for providing VRT-325 as well as Dr. J. Riordan (University of North Carolina, Chapel Hill) and CFFT for CFTR Ab596. Primary airway epithelial cells were from our Biobank of respiratory tissues of CRCHUM/IRCM of the Respiratory Health Network of FRQS. Finally, we acknowledge the logistical assistance from the Research Support Office, CRCHUM.

## FIGURE LEGENDS:

**Figure 1. Decrease of CFTR function after PsaDM treatment in CFBE-wt airway cell monolayers.** CFBE-wt cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h with either 10% of LB or *P. aeruginosa* filtrate (Psa diffusible material, PsaDM) before short-circuit current measurements ( $I_{short-circuit}$ ) in an Ussing chamber. **A.** Intact cell monolayers were bathed in a symmetrical physiological medium supplemented with 10  $\mu$ M amiloride, and then sequentially exposed to a combination of 10  $\mu$ M forskolin and 100  $\mu$ M IBMX, followed by 30  $\mu$ M genistein and, finally, 20  $\mu$ M CFTR<sub>Inh-172</sub> (CFFT Inc.). **B.** A Cl<sup>-</sup> gradient was established by bathing the cell monolayers with an asymmetrical physiological solution (low Cl<sup>-</sup> concentration solution at the apical side and high Cl<sup>-</sup> concentration at the basolateral side) and the basolateral membrane was permeabilized with 7.5  $\mu$ M amphotericin B. Cells were then sequentially exposed to a combination of forskolin, IBMX and genistein, followed by CFTR<sub>Inh-172</sub>. Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition (LB and PsaDM) in (**A** and **B**) while quantification of the mean  $\Delta I_{Fk+IBMX+Genistein}$  and  $\Delta I_{CFTRInh172}$  short-circuit currents (in  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>) after LB and PsaDM exposure is reported in bottom panels (**A**, intact condition, n=5,  $p<0.02$ ; **B**, Cl<sup>-</sup> gradient, n=6,  $p<0.006$ ).

**Figure 2. Decrease CFTR expression after PsaDM treatment.** CFBE-wt and CFBE- $\Delta$ F508 cells were cultured for 8 days (until confluence was reached), then treated with either 10% of LB or PsaDM for 24 h. Levels of CFTR mRNA (**A**, CFBE-wt, n=8, NS and CFBE- $\Delta$ F508, n=5,  $p<0.006$ ) and protein expression (**B**, n=5,  $p<0.04$ ) were quantified and reported as % of the LB control. Representative immunoblots are also presented in **B**.

**Figure 3: Decrease of CFTR membrane expression after PsaDM treatment in CFBE-wt airway cells.** **A.** The level of CFTR expression at the cell surface in CFBE-wt cells treated for 24 h with LB or PsaDM was measured by immunoblotting after surface biotinylation, and reported as % of LB control (n=6,  $p<0.04$ ). A representative immunoblot is presented at the left panel. **B.** Subconfluent CFBE-wt cells were treated with either LB or PsaDM for 24 h, then fixed and stained with the anti-CFTR antibody coupled to Alexa Fluor 488 conjugated

anti-mouse antibody (green). Nuclei were stained with To-Pro-3 in all conditions. Primary and secondary antibodies (Ab) were also incubated alone for negative controls. Fluorescent images were captured at x100 magnification by a Confocal Leica TCS\_SP5 microscope. Representative images (from 6 different experiments) are reported.

**Figure 4. Impact of PsaDM treatment on degradation and synthesis of CFTR protein in CFBE-wt airway cell monolayers.** **A.** CFBE-wt cells were treated with 100  $\mu$ g/ml of cycloheximide (CHX, for 2, 8, 18, 24 and 32h, **A**, n=6,  $p<0.05$ ) or with 5  $\mu$ M of MG132 (for 2, 8 and 18 h, **B**, n=11,  $p<0.04$ ), in the presence of 10% LB or PsaDM. The whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE separation and analysed by immunoblotting with anti- $\beta$ -actin (used as loading control) and anti-CFTR antibodies to evaluate the kinetics of CFTR protein degradation in the presence of CHX (**A**) and the accumulation of newly synthesized CFTR proteins in the presence of the proteasomal inhibitor MG132 (**B**).

**Figure 5: Impact of PsaDM treatment on CFTR and EGFR proteins in CFBE-wt airway cell monolayers.** CFBE-wt cells were treated with 5  $\mu$ M of MG132 (for 18h) alone or in combination with CHX (MG132+CHX), in the presence of LB or PsaDM. CFTR (**A**, **B**), EGFR (**A**, **C**) and  $\beta$ -actin (**A**, **D**) proteins were detected by immunoblotting with their respective antibodies. A representative immunoblot is presented in panel A and protein levels were quantified and reported as % of the LB control (**B**, **C**, **D**). n= 6.  $p<0.03$ . NS: non-significant.

**Figure 6. Impairment of  $\Delta$ F508-CFTR functional rescue after PsaDM treatment.** **A.** CFTR band C protein expression in non-treated CFBE- $\Delta$ F508 cells (LB) and in CFBE- $\Delta$ F508 cells treated with 5  $\mu$ M VRT-325 for 24 h in the presence of 10% LB (LB+VRT-325) or PsaDM (PsaDM+VRT-325) was quantified and reported as % of the LB control (n=8,  $p<0.04$ ). A representative immunoblot is also presented in the left panel. **B.** Short-circuit currents ( $I_{short-circuit}$ ) were measured in an Ussing chamber through CFBE- $\Delta$ F508 cells, cultured on permeant filters at the air-liquid interface. After mounting in an Ussing chamber, cells were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  $Cl^-$  concentration solution at the apical side and high  $Cl^-$  concentration at the basolateral side) and the basolateral side



was permeabilized with 7.5  $\mu\text{M}$  amphotericin B. Upon  $I_{sc}$  stabilization, cells were exposed to a mix of forskolin, IBMX and genistein, and then with CFTR<sub>Inh-172</sub>. Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition: non-treated (LB), treated for 24 h before electrophysiological measurements with VRT-325 (LB+VRT-325) or with a combination of VRT-325 and PsADM (PsADM+VRT-325). Quantifications of the mean  $\Delta I_{Fk+IBMX+Genistein}$  and  $\Delta I_{CFTRInh172}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) in LB, LB+VRT-325 and PsADM+VRT-325 conditions are reported in the bottom panel ( $n=6$ ,  $p<0.03$ ).

**Figure 7. Inhibition of wt-CFTR function after PsADM treatment in non-CF human primary airway cell monolayers.** Short-circuit current measurements ( $I_{short-circuit}$ ) in an Ussing chamber were performed on non-CF human primary airway cell monolayers, cultured on permeant filters at the air-liquid interface, treated for 24 h with either 5% LB or PsADM. After mounting in an Ussing chamber, cells were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  $\text{Cl}^-$  physiological solution at the apical side and high  $\text{Cl}^-$  solution at the basolateral side), supplemented with 10  $\mu\text{M}$  amiloride. Upon  $I_{sc}$  stabilization, cells were treated with a combination of forskolin and IBMX, followed by CFTR<sub>Inh-172</sub>. Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition (**A**, LB (upper panel) and PsADM (lower panel)) while quantifications of the mean  $\Delta I_{Fk+IBMX}$  and  $\Delta I_{CFTRInh172}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) are reported in (**B**,  $n=7$ ,  $p<0.05$ ).

**Figure 8. Inhibition of  $\Delta\text{F508}$ -CFTR functional rescue after PsADM treatment in CF human primary airway cell monolayers.** Short-circuit current measurements ( $I_{short-circuit}$ ) in an Ussing chamber were performed on CF human primary airway cell monolayers, cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated or not for 24 h with 10  $\mu\text{M}$  VRT-325 in combination with either 5% LB or PsADM. After mounting in an Ussing chamber, filters were bathed with an asymmetrical physiological solution (low  $\text{Cl}^-$  physiological solution at the apical side and high  $\text{Cl}^-$  at the basolateral side), supplemented with 10  $\mu\text{M}$  amiloride. Upon  $I_{sc}$  stabilization, the filters were treated with a combination of forskolin and IBMX, followed by CFTR<sub>Inh-172</sub>. Representative  $I_{short-circuit}$  traces are reported for each condition (**A**, LB (upper panel), LB+VRT-325 (middle panel) and PsADM+VRT-325 (lower panel)) while

quantifications of the mean  $\Delta I_{Fk+IBMX}$  and  $\Delta I_{CFTRInh172}$  short-circuit currents (in  $\mu A/cm^2$ ) are reported in **(B)**.  $n=6$ ,  $p<0.03$ .

## Reference List

1. Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflügers Arch* 2003 January;445(4):495-8.
2. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van EM, Banfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB, Jr., Welsh MJ, Zabner J. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 2012 July 5;487(7405):109-13.
3. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(9):1703-15.
4. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, Buhl R, Schmitt-Grohe S, Zielen S, Schubert R. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* 2010 May;50(2):152-7.
5. Cohen-Cymbarknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax* 2013 December;68(12):1157-62.
6. Swiatecka-Urban A, Moreau-Marquis S, Maceachran DP, Connolly JP, Stanton CR, Su JR, Barnaby R, O'toole GA, Stanton BA. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 March;290(3):C862-C872.
7. Zahm JM, Delavoie F, Toumi F, Nawrocki-Raby B, Kileztky C, Michel J, Balossier G, Johnson M, Coraux C, Birembaut P. Long acting beta2-agonist and corticosteroid restore airway glandular cell function altered by bacterial supernatant. *Respir Res* 2010;11:6.
8. Le Gars M., Descamps D, Roussel D, Saussereau E, Guillot L, Ruffin M, Tabary O, Hong SS, Boulanger P, Paulais M, Malleret L, Belaaouaj A, Edelman A, Huerre M, Chignard M, Sallenave JM. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 January 15;187(2):170-9.

9. Haenisch MD, Ciche TA, Luckie DB. Pseudomonas or LPS exposure alters CFTR iodide efflux in 2WT2 epithelial cells with time and dose dependence. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 April 16;394(4):1087-92.
10. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003 November;9(6):486-91.
11. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, Molin S. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012 December;10(12):841-51.
12. Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008 December;35(3):135-53.
13. Ciofu O, Hansen CR, Hoiby N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2013 May;19(3):251-8.
14. Riordan JR. CFTR Function and Prospects for Therapy. *Annu Rev Biochem* 2008;77:701-26.
15. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* 2012 October;45(15):1132-44.
16. Van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, Knapp T, Makings LR, Miller M, Neuberger T, Olson E, Panchenko V, Rader J, Singh A, Stack JH, Tung R, Grootenhuis PD, Negulescu P. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 June;290(6):L1117-L1130.

17. Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J* 2007 September 1;406(2):257-63.
18. Rowe SM, Pyle LC, Jurkevante A, Varga K, Collawn J, Sloane PA, Woodworth B, Mazur M, Fulton J, Fan L, Li Y, Fortenberry J, Sorscher EJ, Clancy JP. DeltaF508 CFTR processing correction and activity in polarized airway and non-airway cell monolayers. *Pulm Pharmacol Ther* 2010 August;23(4):268-78.
19. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 October 5;108(46):18843-8.
20. Kim CP, Wellhauser L, Huan LJ, Ramjeesingh M, Bear CE. A Chemical Corrector Modifies the Channel Function of F508del-CFTR. *Mol Pharmacol* 2010 September;78(3):411-8.
21. Farinha CM, King-Underwood J, Sousa M, Correia AR, Henriques BJ, Roxo-Rosa M, Da Paula AC, Williams J, Hirst S, Gomes CM, Amaral MD. Revertants, Low Temperature, and Correctors Reveal the Mechanism of F508del-CFTR Rescue by VX-809 and Suggest Multiple Agents for Full Correction. *Chem Biol* 2013 July 25;20(7):943-55.
22. He L, Kota P, Aleksandrov AA, Cui L, Jensen T, Dokholyan NV, Riordan JR. Correctors of DeltaF508 CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *FASEB J* 2013 February;27(2):536-45.
23. Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, Roldan A, Verkman AS, Kurth M, Simon A, Hegedus T, Beekman JM, Lukacs GL. Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function. *Nat Chem Biol* 2013 July;9(7):444-54.

24. Becq F, Mettey Y, Gray MA, Galletta LJ, Dormer RL, Merten M, Metaye T, Chappe V, Marvingt-Mounir C, Zegarra-Moran O, Tarran R, Bulteau L, Derand R, Pereira MM, McPherson MA, Rogier C, Joffre M, Argent BE, Sarrouilhe D, Kammouni W, Figarella C, Verrier B, Gola M, Vierfond JM. Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem* 1999 September 24;274(39):27415-25.
25. Robert R, Carlile GW, Pavel C, Liu N, Anjos SM, Liao J, Luo Y, Zhang D, Thomas DY, Hanrahan JW. Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol* 2008 February;73(2):478-89.
26. Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993 May;8(5):522-9.
27. Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, Sorscher EJ, Clancy JP. Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *J Physiol* 2005 December 1;569(Pt 2):601-15.
28. Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maille E, Adam D, Lingée S, Ferraro P, Desrosiers M, Coraux C, Brochiero E. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* 2012 December;40:1390-400.
29. Berube J, Roussel L, Nattagh L, Rousseau S. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2010 July 16;285(29):22299-307.
30. Maille E, Trinh NT, Prive A, Bilodeau C, Bissonnette E, Grandvaux N, Brochiero E. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011 December;301(6):L945-L955.
31. Leroy C, Prive A, Bourret JC, Berthiaume Y, Ferraro P, Brochiero E. Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption

across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 December;291(6):L1207-L1219.

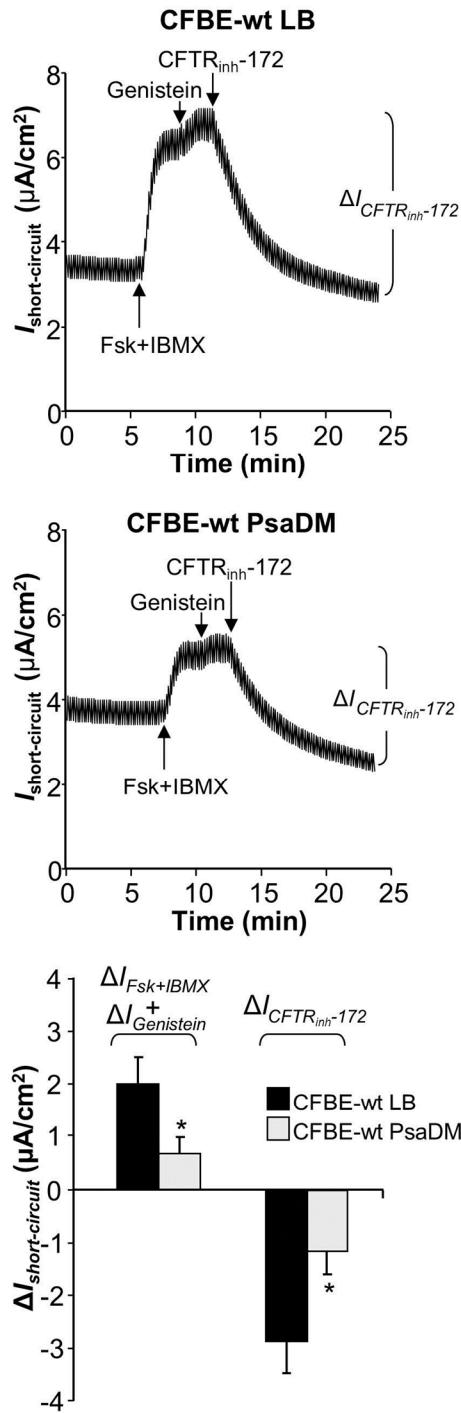
32. Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, Brochiero E. Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 May;286(5):L1027-L1037.
33. Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 November;295(5):L866-L880.
34. Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, Noel J, Brochiero E. Involvement of KATP and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007 July 13;293:L870-L882.
35. Buyck JM, Verriere V, Benmahdi R, Higgins G, Guery B, Matran R, Harvey BJ, Faure K, Urbach V. *P. aeruginosa* LPS stimulates calcium signaling and chloride secretion via CFTR in human bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2013 January;12(1):60-7.
36. Schwarzer C, Wong S, Shi J, Matthes E, Illek B, Ianowski JP, Arant RJ, Isacoff E, Vais H, Foskett JK, Maiellaro I, Hofer AM, Machen TE. *Pseudomonas aeruginosa* Homoserine lactone activates store-operated cAMP and cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent Cl<sup>-</sup> secretion by human airway epithelia. *J Biol Chem* 2010 November 5;285(45):34850-63.
37. Illek B, Fu Z, Schwarzer C, Banzon T, Jalickee S, Miller SS, Machen TE. Flagellin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 October;295(4):L531-L542.
38. Schwarzer C, Fischer H, Kim EJ, Barber KJ, Mills AD, Kurth MJ, Gruenert DC, Suh JH, Machen TE, Illek B. Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl<sup>-</sup> transport in human bronchial epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2008 December 15;45(12):1653-62.

39. Rubino R, Bezzetti V, Favia M, Facchini M, Tebon M, Singh AK, Riederer B, Seidler U, Iannucci A, Bragonzi A, Cabrini G, Reshkin SJ, Tamanini A. *Pseudomonas aeruginosa* reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1. *Pflugers Arch* 2014 March 5;in press.
40. Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, Joseph P, Cho YH, Hassett DJ, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* 2006 July;8(7):1121-33.
41. Maceachran DP, Ye S, Bomberger JM, Hogan DA, Swiatecka-Urban A, Stanton BA, O'toole GA. The *Pseudomonas aeruginosa* secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* 2007 August;75(8):3902-12.
42. Bomberger JM, Ye S, Maceachran DP, Koeppen K, Barnaby RL, O'toole GA, Stanton BA. A *Pseudomonas aeruginosa* toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. *PLoS Pathog* 2011 March;7(3):e1001325.

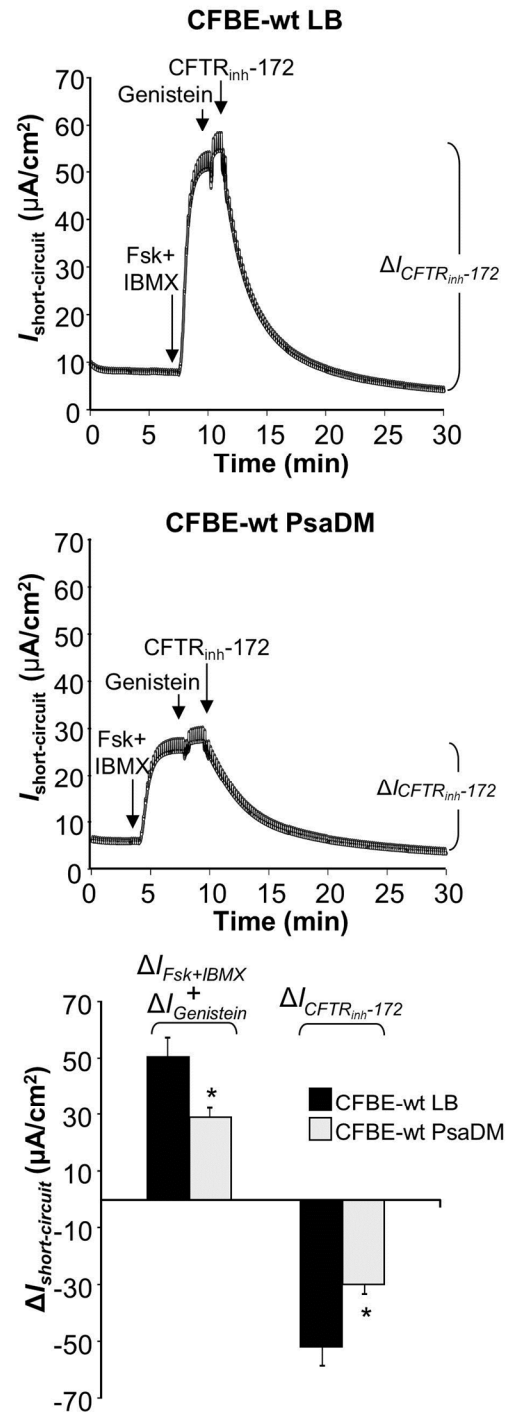


**FIGURE 1**

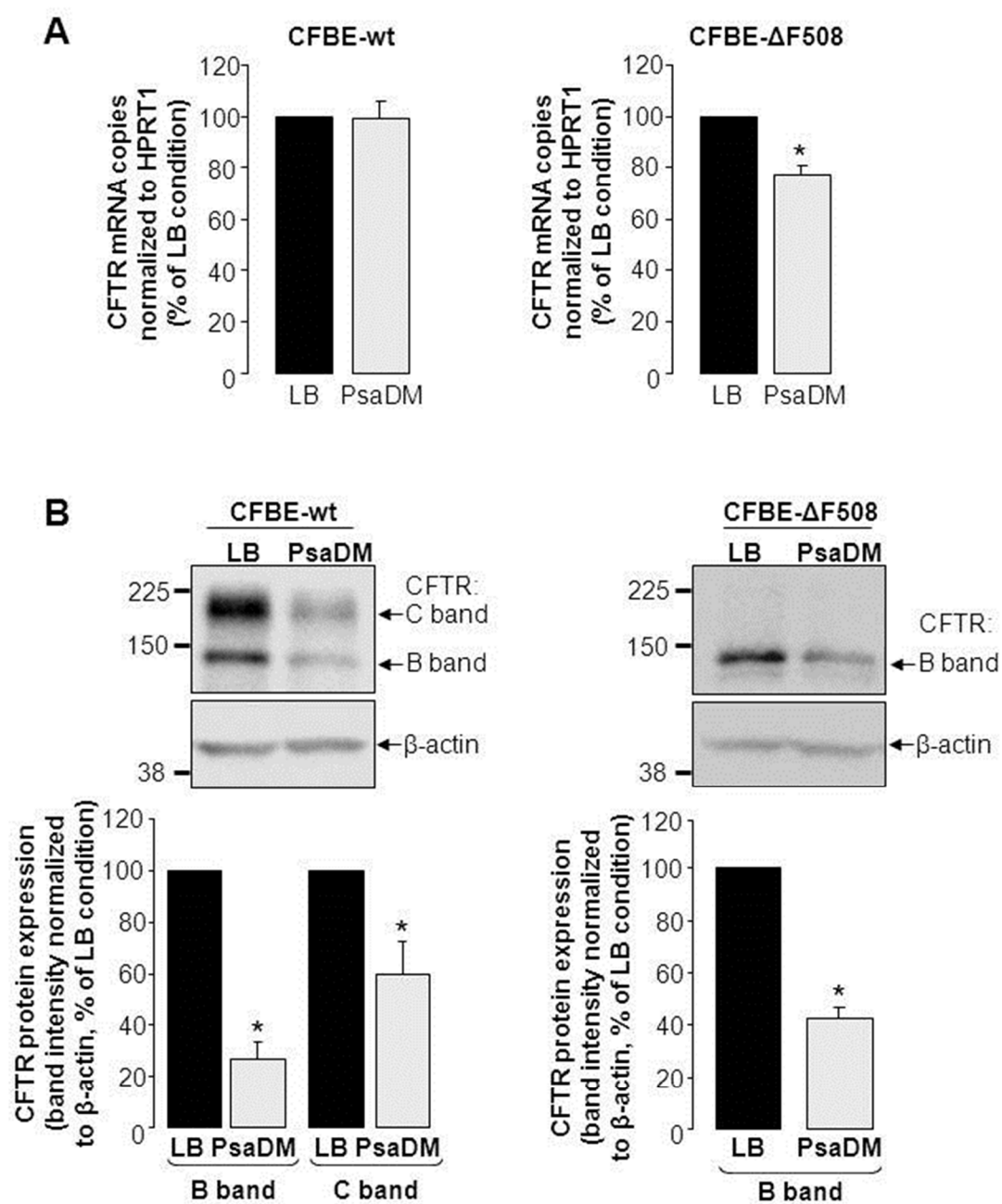
**A- Intact**



**B- Basolateral membrane permeabilization + Cl<sup>-</sup> gradient**



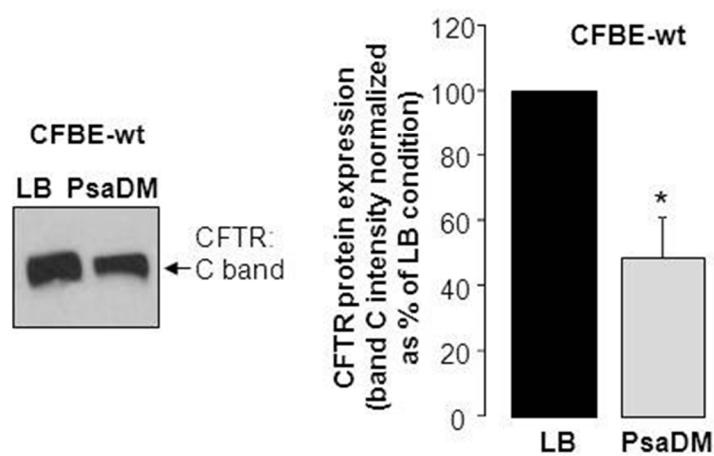
**FIGURE 2**



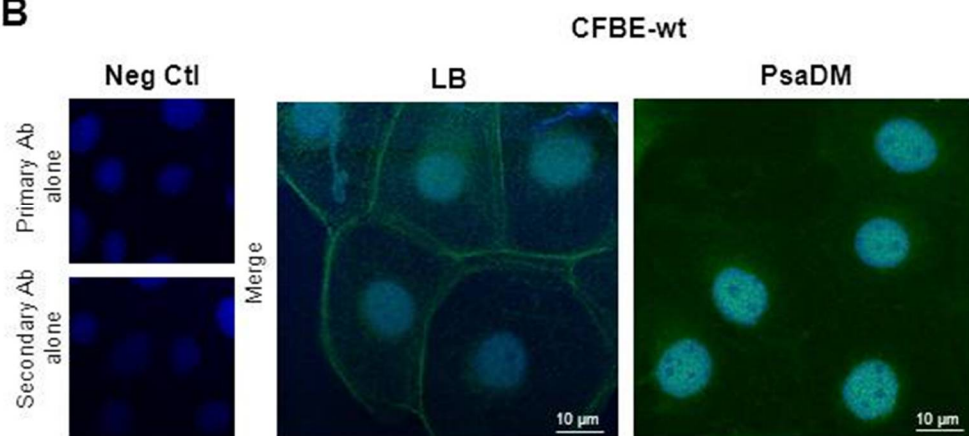
**FIGURE 3**

**A**

CFTR membrane expression

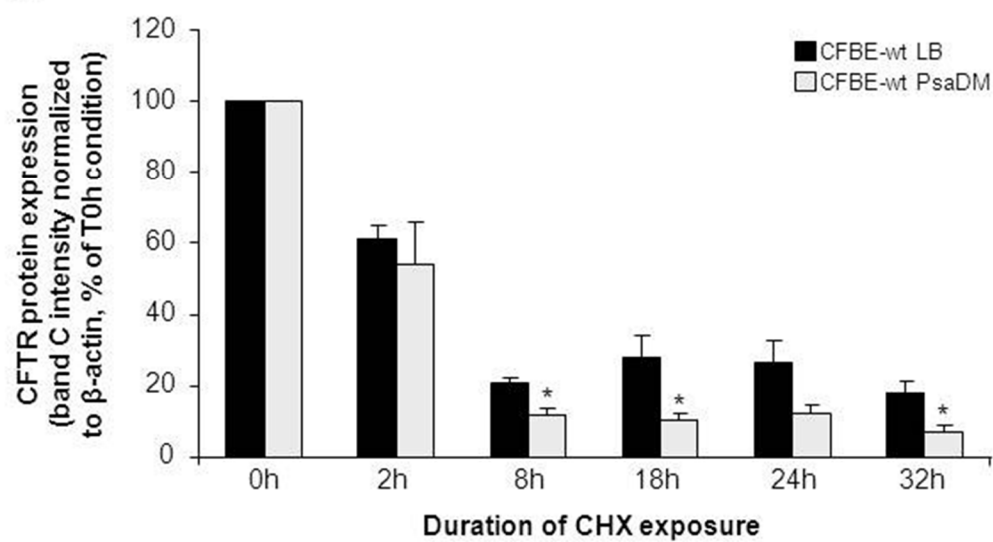


**B**

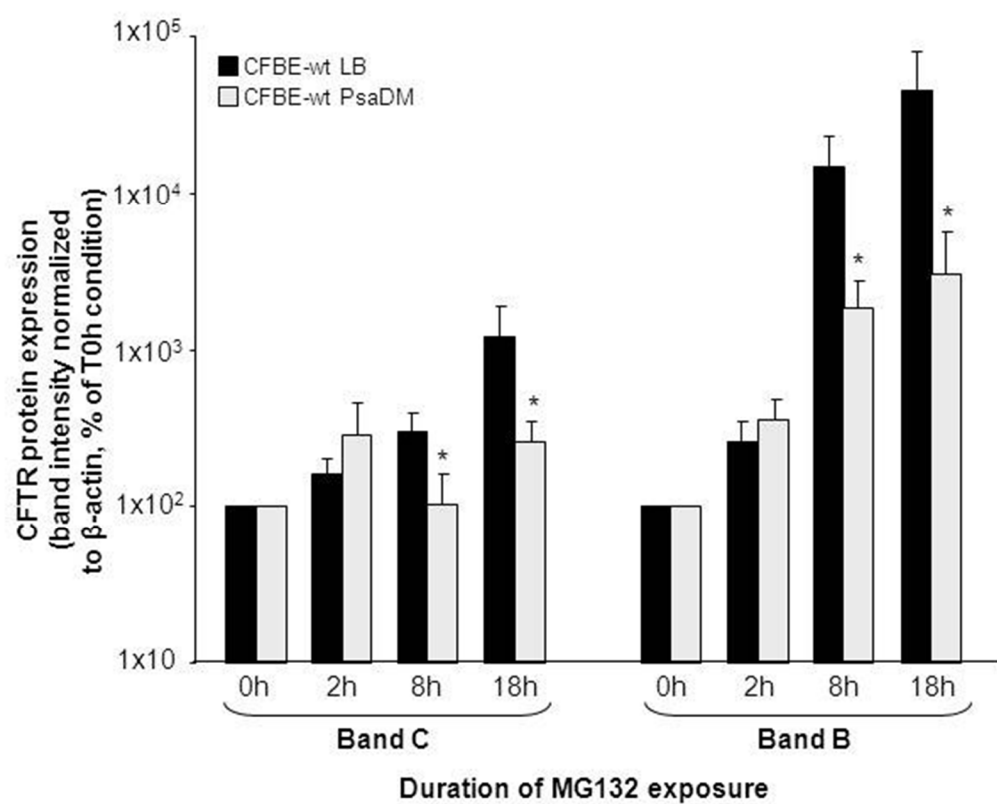


**FIGURE 4**

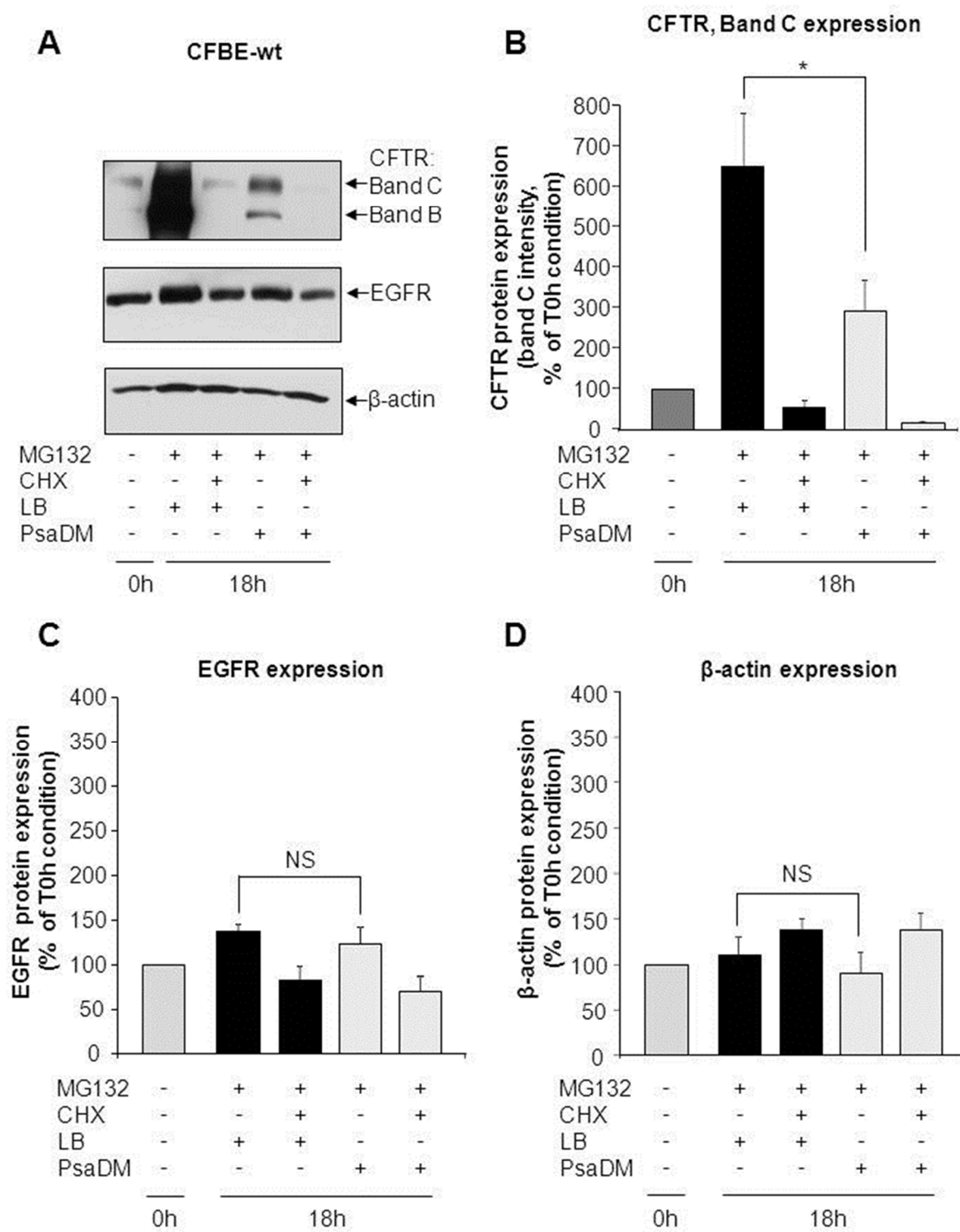
**A**



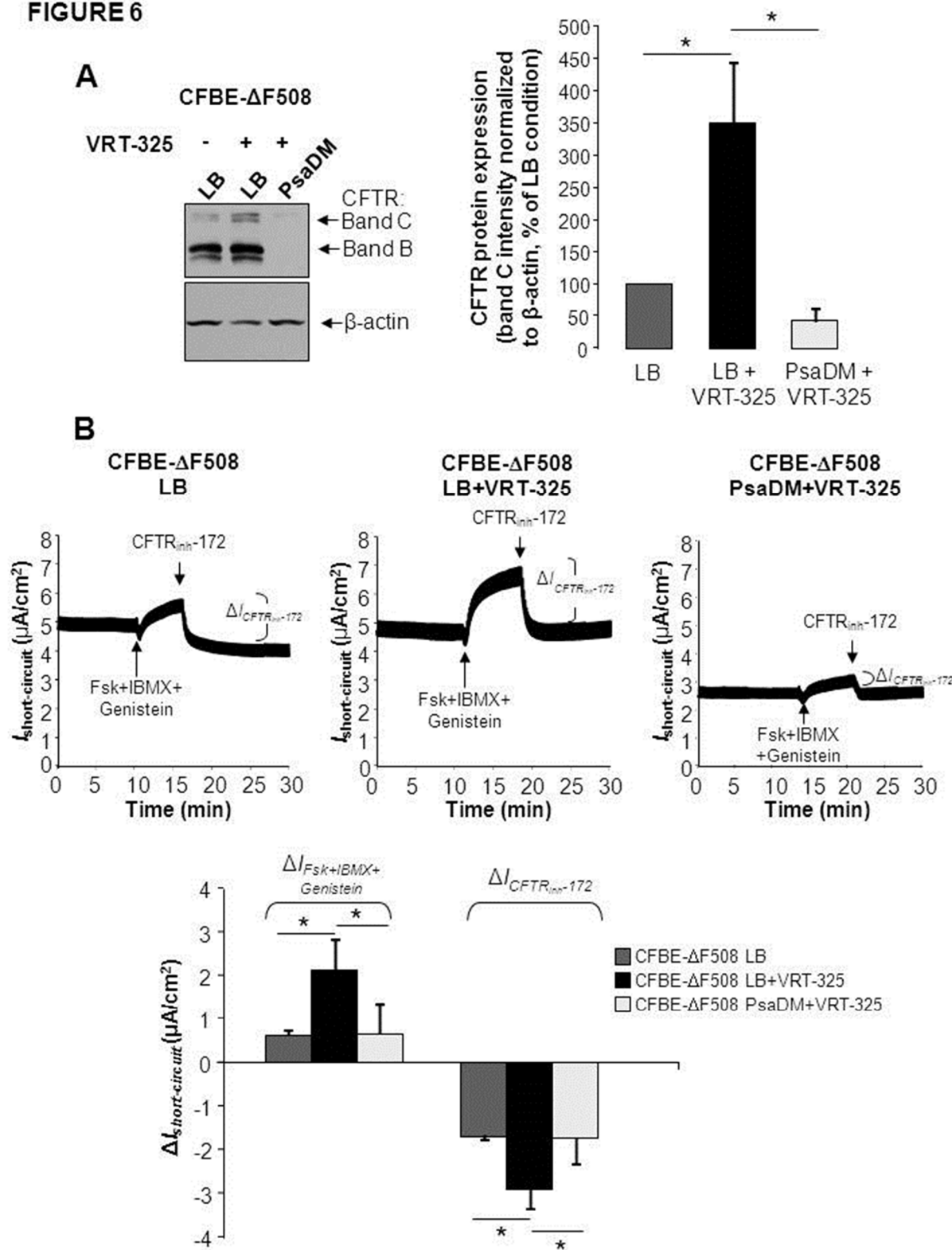
**B**



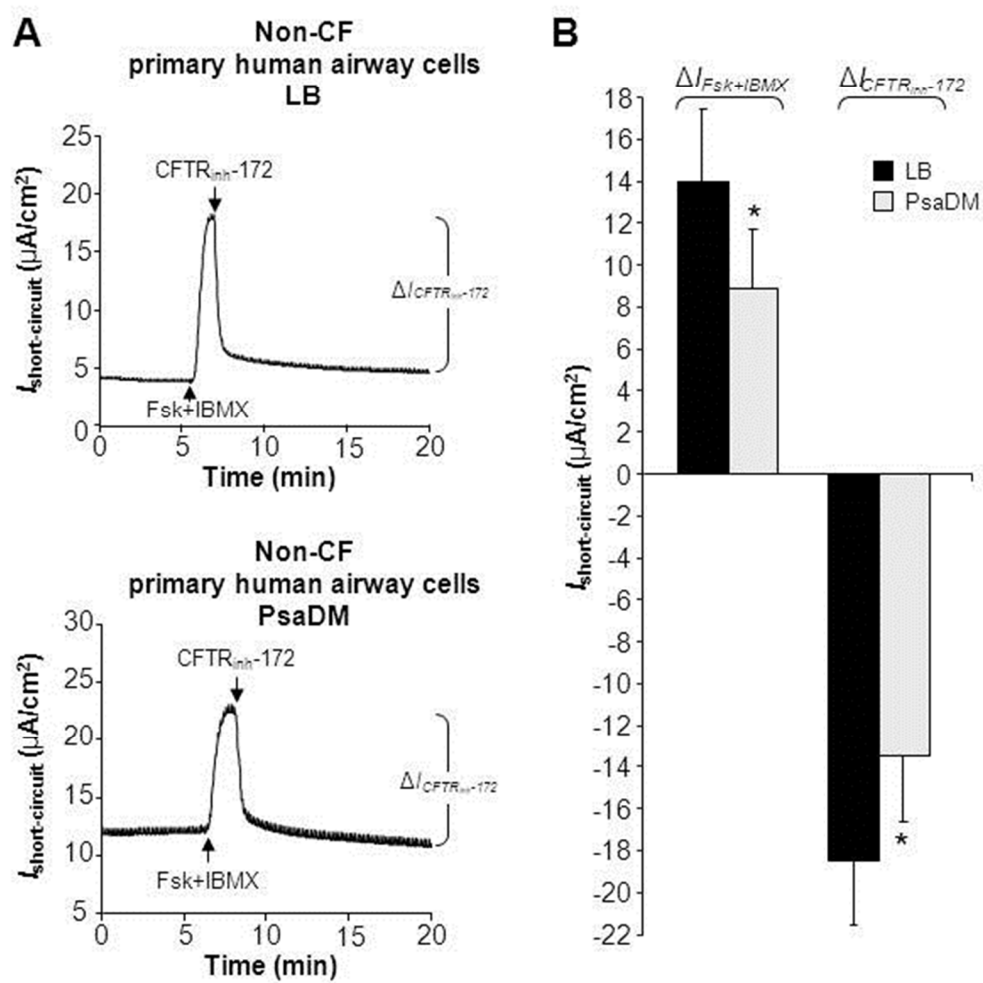
**FIGURE 5**



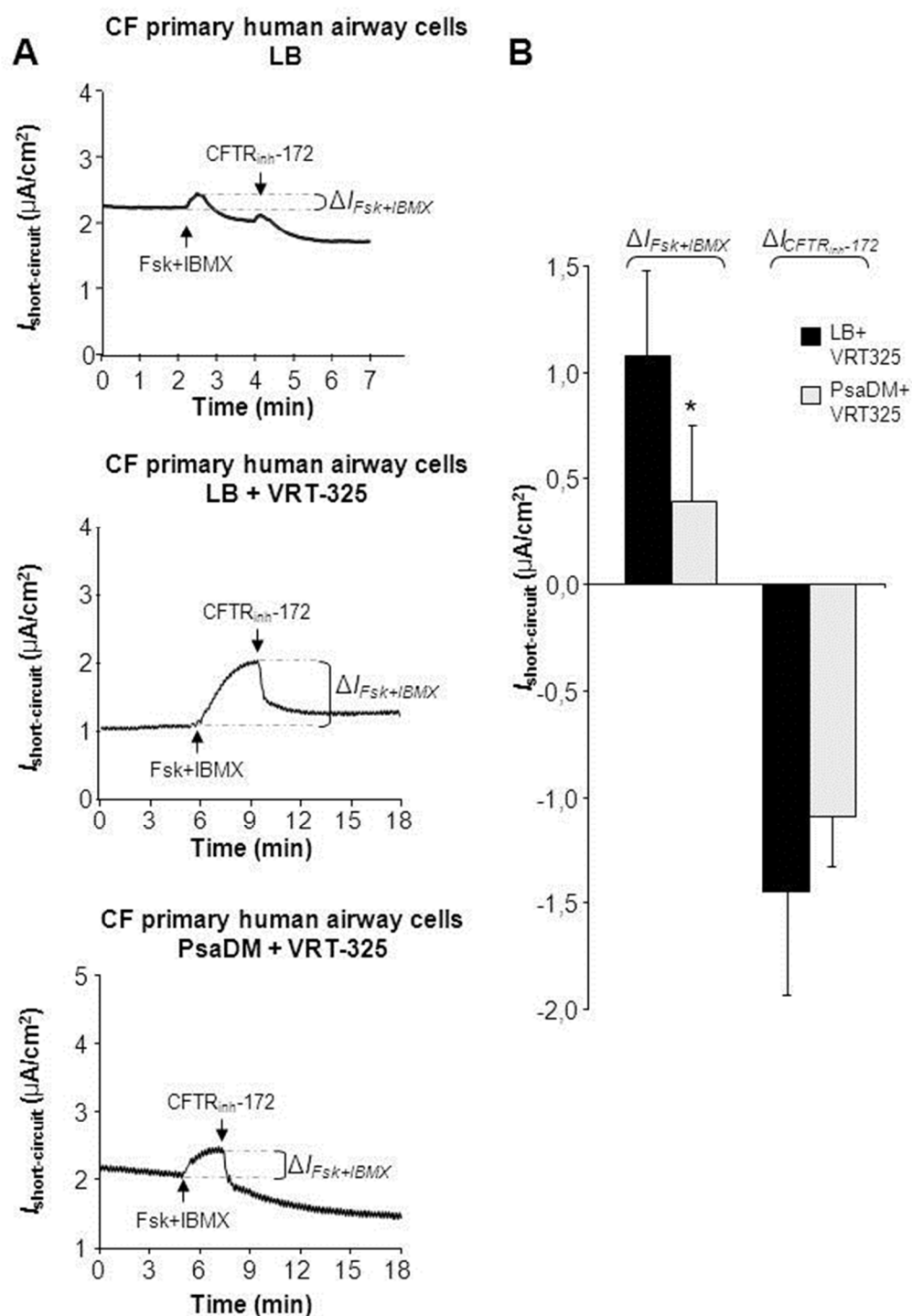
**FIGURE 6**



**FIGURE 7**



**FIGURE 8**





## Chapitre 4; Discussion

### 4.1 Impact de l'hyperglycémie et de l'infection sur le transport ionique

#### 4.1.1 CFRD

Le CFRD est associé à une détérioration plus rapide de la fonction respiratoire et un taux de mortalité accru. Une des fonctions importantes de l'épithélium des voies aériennes est le transport ionique. En effet, celui-ci est primordial pour le maintien de la clairance mucociliaire nécessaire à la défense contre les pathogènes. Les canaux  $\text{Cl}^-$ , et secondairement les canaux  $\text{K}^+$ , sont impliqués dans cet équilibre (33, 38).

##### 4.1.1.1 Canaux $\text{Cl}^-$

L'impact de l'hyperglycémie au niveau du poumon, mis à part son potentiel sur la croissance bactérienne, était méconnu. Afin de mieux comprendre les conséquences de l'hyperglycémie sur le transport ionique, nous avons réalisé des mesures électrophysiologiques de courant transépithélial en chambre de Ussing. Dans notre étude, nous avons noté une réduction du courant  $\text{Cl}^-$  CFTR lors d'une exposition à un niveau élevé de glucose. Cette réduction pourrait être associée à l'augmentation du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie puisque des évidences soulevées par Harrington *et al.* 1999 (77) ont relié le mécanisme d'ouverture et de fermeture du canal CFTR à l'état d'oxydation de celui-ci. Toutefois, d'autres investigations sont nécessaires afin de clairement définir les mécanismes possiblement impliqués. Nos données indiquent que l'hyperglycémie ne semble pas affecter l'activité de tous les canaux  $\text{Cl}^-$  apicaux puisque les courants générés par les canaux sensibles à l'UTP, appelés CaCC, ne semblent pas altérés par les hauts niveaux de glucose. Le fait que ces canaux  $\text{Cl}^-$  ne soient pas diminués, contrairement au canal CFTR, pourrait s'expliquer par le fait que ces deux types de canaux ont des mécanismes d'activation différents. Ainsi la diminution du courant CFTR par l'hyperglycémie pourrait être spécifique de ce canal. Il se peut aussi que les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons fait les expériences ne permettent pas de voir une diminution de l'activité des canaux CaCC, si le mécanisme était par

exemple plus transitoire. Toutefois, nous avons noté que ce courant  $\text{Cl}^-$  activé par l'UTP est plus faible dans les cellules bronchiques FK, comparé aux cellules non-FK, en accord avec une étude préalable de Ruffin *et al.* (101). Les mécanismes responsables de la diminution de la fonction pulmonaire en présence de diabète n'ont pas été déterminés et restent mal documentés (170). Il a été suggéré que l'inflammation, causée par le diabète, pourrait induire des dommages épithéliaux, pouvant se traduire par une perte de fonction pulmonaire (170). La diminution de la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  chez les patients non FK que nous avons observé permet d'envisager une autre option selon laquelle la réduction du transport ionique de  $\text{Cl}^-$  pourrait avoir un impact sur la clairance mucociliaire et ainsi affecter la première ligne de défense de l'organisme. Dans le cas des patients FK, si du CFTR résiduel était présent à la membrane plasmique, la fonction de celui-ci pourrait être diminuée, accentuant ainsi le défaut déjà présent.

#### **4.1.1.2 Canaux $\text{K}^+$**

Des études menées par différents groupes dans des modèles cellulaires non épithéliaux (126-128) montrent que certains canaux  $\text{K}^+$  sont modulés par l'hyperglycémie, résultats que nous confirmons dans nos expérimentations sur les cellules des voies aériennes. Chu *et al.* (128) ont observé une augmentation de l'expression des canaux  $\text{K}^+$  voltages-dépendants en présence d'hyperglycémie dans les cellules  $\beta$ , qui pourrait être médiée par les récepteurs de l'angiotensine II. Contrairement à eux, nous observons une diminution du courant  $\text{K}^+$  basolatéral des cellules épithéliales bronchiques, mais un tout autre mécanisme pourrait être impliqué. Celui-ci reste à déterminer puisqu'au niveau pulmonaire, aucune étude sur l'impact de l'hyperglycémie sur les canaux  $\text{K}^+$  n'avait été publiée à notre connaissance. D'autre part, il n'est pas exclu que ce soit l'inhibition des canaux  $\text{K}^+$  qui entraîne une diminution de la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  puisque l'activité de ces deux types de canaux est intrinsèquement reliée.

L'impact de l'hyperglycémie sur ces canaux impliqués dans la sécrétion liquidienne au niveau des voies aériennes nous laisse supposer que les fortes concentrations de glucose présentes pourraient affecter la clairance mucociliaire, ce qui pourrait avoir un impact plus important en FK où cette fonction est déjà fortement réduite. Toutefois, cette hypothèse doit être vérifiée.

### 4.1.2 Infection à *Pseudomonas aeruginosa*

L'infection est une caractéristique importante de la pathologie FK et chez les patients atteints de maladie obstructive chronique. Comprendre l'impact de *P. aeruginosa* sur le transport ionique et liquidien est donc primordial afin de développer des thérapies efficaces en FK.

#### 4.1.2.1 CFTR

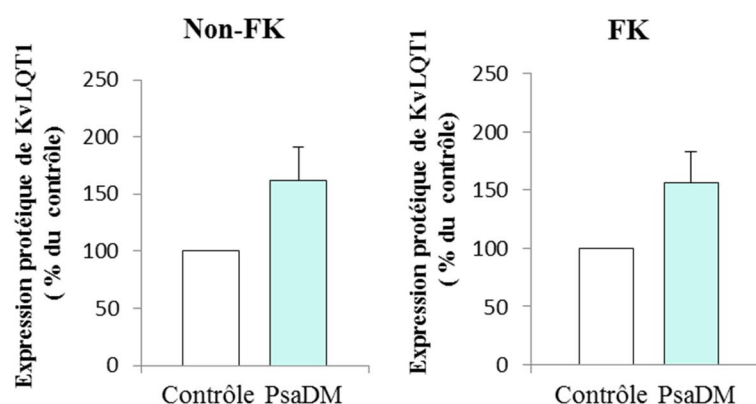
Plusieurs évidences ont montré que l'infection pouvait affecter la fonction et/ou l'expression du CFTR-WT à la baisse (69-73, 171) alors que d'autres montrent plutôt une augmentation (74). Les conditions expérimentales (temps d'exposition, modèles cellulaires, souches bactériennes) sont probablement en grande partie responsables de ces disparités. Contrairement à un traitement aigu, une exposition prolongée (ex : 24h) aux exoproduits bactériens entraîne le plus souvent une diminution du CFTR d'après les données de la littérature ainsi que nos résultats sur des modèles de cellules épithéliales non-FK et FK. Plus précisément, nos données montrent que le PsaDM diminue l'expression du CFTR-WT total, du CFTR-F508del immature ainsi que la fonction du CFTR-WT. Cette réduction semble être médiée par une augmentation du recyclage et de la dégradation de la protéine. D'après des données de la littérature, cet effet pourrait être causé par divers facteurs de virulence comme le Cif et la pyocyanine (70, 71, 171). En fait, il est possible que plus d'une composante du filtrat bactérien soit à l'origine de cet effet. En effet, des résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent aussi que des élastases bactériennes soient impliquées dans cet effet délétère. La réduction observée de l'expression semble plutôt spécifique du CFTR, puisque l'expression de deux autres protéines, soit le récepteur EGFR membranaire et la  $\beta$ -actine ne semblent pas affectées par la présence de ce filtrat d'après nos expériences.

Nos résultats, appuyés par plusieurs de la littérature, démontrent un effet néfaste de *P. aeruginosa* sur le courant  $\text{Cl}^-$  CFTR-WT. Ils mettent donc l'accent sur la nécessité d'éradiquer l'infection des patients souffrant de diverses pathologies pulmonaires, comme les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC). La perte d'un CFTR fonctionnel au niveau des voies aériennes pourrait ainsi rendre plus difficile l'élimination du mucus, permettant l'établissement d'un environnement favorable à la croissance bactérienne et donc aux

infections. Nos résultats indiquent qu'un mécanisme post traductionnel pourrait être impliqué dans la régulation à la baisse du CFTR-WT par *P. aeruginosa*, mais de plus amples expérimentations sont nécessaires afin de bien comprendre ce phénomène. Finalement, nos données sont plutôt inquiétantes pour les thérapies correctrices envisageant de cibler le CFTR F508del des patients FK fréquemment infectés par *P. aeruginosa* (48, 50). Il sera donc important dans le futur de réussir à trouver une stratégie pour contourner cet effet néfaste de l'infection sur la correction de CFTR.

#### 4.1.2.2 Canaux K<sup>+</sup>

L'impact du PsaDM sur les canaux K<sup>+</sup>, qui jouent aussi un rôle primordial dans le transport liquidien, fait aussi l'objet d'études au laboratoire. Les données préliminaires obtenues ne semblent pas montrer d'impact du PsaDM sur l'expression du canal KvLQT1. Or, nous avons précédemment montré que ce canal joue un rôle important dans la réparation épithéliale et le transport ionique/liquidien.



**FIGURE 19. Données préliminaires montrant l'expression du canal KvLQT1 suite à l'exposition au PsaDM.** Quantification de l'expression protéique totale des canaux KvLQT1 par western-blot (exprimée en pourcentage du contrôle) dans des cellules primaires des voies aériennes humaines non-FK (n=6) et FK (n=3), en présence ou non de PsaDM. *Données non publiées.*

Il a déjà été proposé que le canal KvLQT1 pourrait faciliter la sécrétion de Cl<sup>-</sup> par le CFTR résiduel en FK et ainsi augmenter la clairance mucociliaire (1). Puisque ce canal semble être épargné dans notre modèle d'infection, il pourrait donc demeurer un candidat

potentiellement intéressant. Nous poursuivons donc nos études au laboratoire afin de clairement définir l'impact du PsDM sur l'expression et la fonction du KvLQT1 ainsi deux autres canaux  $K^+$  importants dans la sécrétion liquidienne pulmonaire : les canaux  $K_{ATP}$  et  $KCa 3.1$  (100, 172).

## 4.2 Réparation

Les mécanismes de réparation sont primordiaux pour restaurer l'intégrité et la fonctionnalité de l'épithélium suite à des lésions. En FK, l'efficacité de ces mécanismes est particulièrement cruciale puisque l'épithélium subit des agressions constantes suivant une boucle d'infections/inflammations/lésions (86, 88). Malheureusement, nos données ainsi que celles de nos collaborateurs ont montré que chez ces patients, les mécanismes de réparation /régénération de l'épithélium sont déficients (79, 103). Cette fonction importante de l'épithélium des voies aériennes est, entre autre, dépendante du transport ionique. En effet, les canaux  $K^+$  et le canal CFTR ont été identifiés comme des acteurs clefs de la régulation des processus de réparation épithéliale (79, 100, 172). Nos travaux montrent que les deux composantes de la pathologie FK que nous avons étudiées, soit le diabète et l'infection à *P. aeruginosa*, ont un impact néfaste sur des canaux impliqués dans la réparation. De plus, des études précédentes ont montré un impact de l'hyperglycémie et de l'infection *P. aeruginosa* sur la réparation de différents tissus (106-108, 122, 123). La condition pathologique de la FK pourrait donc être perturbée par plusieurs composantes dont le diabète et l'infection à *P. aeruginosa* qui peuvent diminuer la réparation épithéliale déjà déficiente chez ces patients (79) et ainsi probablement contribuer à la dégradation de l'état de santé du patient.

### 4.2.1 Impact du CFRD sur les processus de réparation

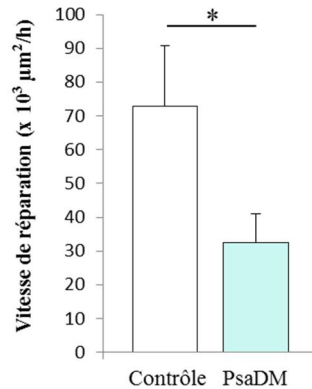
Il a été démontré depuis plusieurs années que la réparation de l'épiderme et de la cornée des patients diabétiques est ralentie (121, 122), mais aucune évidence d'une inhibition de la réparation de l'épithélium respiratoire n'avait été rapportée. Par contre, il a été observé qu'une diminution de la paroi alvéolaire, des capillaires alvéolaires et des artérioles pulmonaires sont causés par le diabète sucré (170). Ces informations laissent envisager qu'une altération de la vitesse de réparation pourrait aussi avoir lieu au niveau pulmonaire. Notre

évaluation de l'impact de l'hyperglycémie sur la réparation épithéliale des monocouches de cellules des voies aériennes FK et non-FK confirme un retard de réparation induit par celle-ci. Les résultats obtenus montrant une baisse du transport ionique en présence de concentration élevée de glucose nous permettent de penser que le ralentissement de la réparation de l'épithélium bronchique non-FK et FK pourrait y être relié, mais cette hypothèse reste à être confirmée par de plus amples expérimentations.

Un défaut de réparation induit par le diabète pourrait accroître l'infection à *P. aeruginosa*, qui se lie préférentiellement à l'épithélium lésé, favorisant ainsi la colonisation bactérienne à *P. aeruginosa* en absence de régénération efficace. De plus, l'hyperglycémie pourrait diminuer la clairance mucociliaire par son effet sur le transport ionique permettant à *P. aeruginosa* de demeurer dans les voies aériennes et ainsi d'y favoriser l'apparition de nouvelles lésions (85). Le CFRD pourrait donc s'ajouter au cercle vicieux d'infection, inflammation et lésions des patients FK.

#### **4.2.2 Impact de l'infection à *P. aeruginosa* sur la réparation épithéliale**

Une diminution de la migration et de la prolifération de divers types cellulaires a été observée en présence de nombreux facteurs contenus dans le PsaDM tels que la pyocyanine et l'élastase (106-108). Nos résultats préliminaires corroborent ces études puisque l'exposition aux exoproduits de *P. aeruginosa* entraîne une diminution drastique de la réparation dans les cellules primaires humaines FK (Figure 20). Des résultats préliminaires du laboratoire semblent indiquer que des élastases sous le contrôle du QS LasR pourraient être responsables en partie de cet effet délétère, bien qu'une autre étude ait montré qu'une souche ne sécrétant pas d'élastase (PA103, n'exprimant pas *lasR*) inhibe tout de même la réparation (106).



**FIGURE 20. Diminution de la vitesse de réparation des cellules primaires des voies aériennes FK suite à l'exposition au PsaDM.** La vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK, mesurée sur 6h, est diminuée en présence de PsaDM (24h avant les plaies, n=7, p<0,02) *Données non publiées.*

Bien que la souche PACF508 que nous utilisons soit un isolat clinique mucoïde provenant d'un patient FK, le mode de culture utilisé *in vitro* est une méthode planctonique (173). Plusieurs facteurs de virulences se retrouvent dans le filtrat bactérien dont la flagelline qui semble activer la voie TLR5 (173). Or il a été précédemment démontré que cette voie pouvait entraîner une augmentation de la migration et de la vitesse de fermeture des plaies dans un modèle de cellules primaires bronchiques (174). D'autres molécules comme le LPS retrouvées dans le filtrat utilisé ont des effets variables dépendamment de leur concentration. En effet, le LPS active la réparation à faible concentration, alors que l'effet inverse est observé à forte concentration (175). Le ralentissement de la réparation de l'épithélium non-FK, observé dans nos expériences, pourrait aussi être causé, du moins en partie, par l'action de *P. aeruginosa* sur le CFTR. Toutefois, cette hypothèse ne pourrait pas être valide dans les monocouches de cellules FK F508del qui ne présentent que très peu de CFTR fonctionnel à la membrane des cellules. En réalité, des mécanismes différents pourraient être impliqués; le même facteur de virulence, comme la pyocyanine par exemple, pourrait altérer la réparation et le CFTR par des processus non reliés (107, 171).

## 4.3 Efficacité des correcteurs en conditions hyperglycémiques ou infectieuses

### 4.3.1 Correcteur et CFRD

Des études *in vitro* démontrent clairement que le Vx-809 permet de corriger la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques portant les mutations F508del (26). Par contre, à ma connaissance, aucune investigation clinique sur l'effet des correcteurs ou de la combinaison d'un correcteur et d'un potentiateur sur l'amélioration de la fonction pulmonaire des patients FK avec diabète comparativement à ceux n'en ayant pas, n'a été réalisée. Il a toutefois été montré que la potentialisation seule du CFTR avec le Vx-770 permet une augmentation de la sécrétion d'insuline des patients FK homozygotes G551D. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose intraveineux augmente de 51 à 346% pour la quasi-totalité des patients testés. La réponse à la prise de glucose orale est augmentée entre 66 et 178% chez tous les patients excepté un (176). De plus, Barrio *et al.* rapportent le cas d'un patient atteint de mutations F508del/G551D souffrant de CFRD, chez qui 13 mois de traitement avec le Vx-770 ont permis d'arrêter complètement la prise d'insuline (26).

Dans notre étude, nous avons observé que le courant CFTR corrigé par le VRT-325 ne semble pas affecté par l'hyperglycémie. Toutefois, nous avons noté que l'effet bénéfique de la correction sur la réparation semble altéré que ce soit dans la lignée cellulaire CFBE- $\Delta$ F508 ou dans les cellules primaires humaines FK. Ce ralentissement ne semble donc pas relié à la perte de correction de CFTR. Il a été montré que le VRT-325 régule à la hausse les canaux  $K^+$  de type hERG, toutefois, nous avons vérifié que les sous-types de canaux  $K^+$  que nous étudions ne sont pas stimulés par le VRT-325. Toutefois, nous pouvons supposer que l'effet inhibiteur observé du glucose sur l'activité des canaux  $K^+$  pourrait être responsable de la baisse de réparation. En effet, la migration cellulaire, par exemple, étant fortement dépendante de l'action conjointe des canaux CFTR et  $K^+$ , la correction du CFTR seule, alors que les courants  $K^+$  sont inhibés en présence d'hyperglycémie, pourrait avoir un effet bénéfique moins grand qu'en condition glycémique normale. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu.

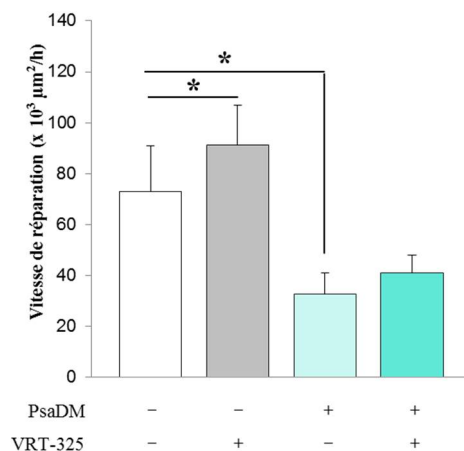


Notre étude ne semble pas montrer de baisse de la correction du CFTR par le VRT-325 en condition hyperglycémique. Ceci laisse supposer que la thérapie visant à corriger le défaut de base de CFTR par les correcteurs pourrait aussi être efficace pour les patients FK CFRD. Cependant, nos résultats sur la réparation épithéliale laissent présager que l'effet des correcteurs sur ce processus pourrait ne pas être optimal chez ces patients.

#### **4.3.2 Correcteurs et infection**

Les pistes explorées publiées dans la littérature et celles de notre laboratoire renforcent l'idée que certains produits sécrétés par *P. aeruginosa* interfèrent avec le CFTR-WT, suggérant que les stratégies de correction de CFTR F508del pourraient être moins efficaces. En effet, nous avons démontré pour la première fois une diminution de la maturation et de la fonction induite par le VRT-325 dans les cellules bronchiques humaines en présence de *P. aeruginosa*. Plusieurs candidats, pouvant interférer avec le CFTR-WT, ont déjà été identifiés (70, 71, 74), mais leur contribution relative n'est pas claire, puisque les conditions expérimentales ainsi que les souches de *P. aeruginosa* utilisées dans les différentes études sont variables. Pourtant, l'identification des produits et la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de CFTR est primordiale afin de développer des stratégies interférant avec ceux-ci. Ainsi, les molécules correctrices du CFTR muté auraient une fonction optimale. Une autre option est le développement de correcteurs qui permettraient une maturation et une fonction efficaces du CFTR-F508del malgré la présence de *P. aeruginosa*.

Les travaux précédents au laboratoire ont montré un potentiel bénéfique des correcteurs sur la réparation. Cependant, comme attendu, le PsaDM altère à la fois l'amélioration de la réparation (voir résultats préliminaires présentés à la Figure 21) et la maturation du CFTR (article 2) par les correcteurs.



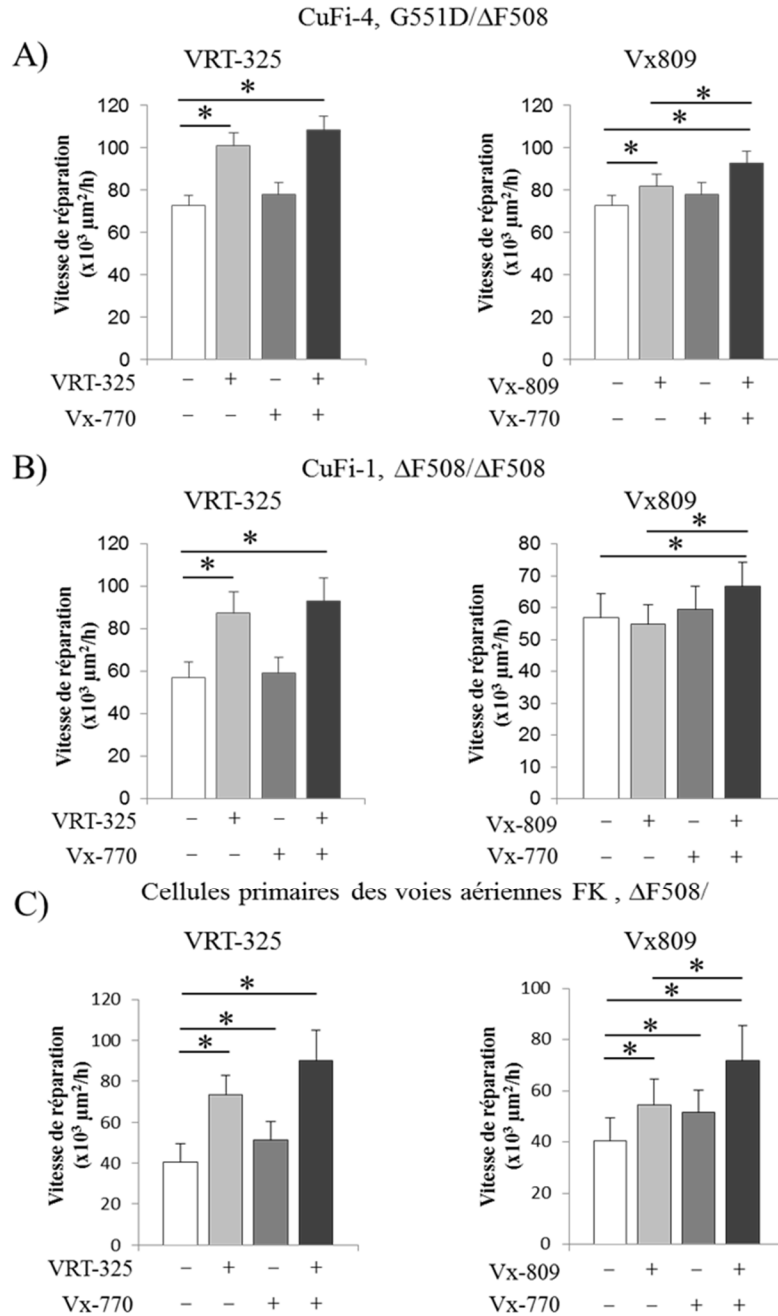
**FIGURE 21. Diminution de l'effet bénéfique du VRT-325 sur la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK en présence de PsaDM.** La vitesse de réparation des plaies, calculée sur une période de 6h, est comparée en condition contrôle et en présence d'un correcteur (VRT-325, 5μM), en présence ou non de PsaDM. (n=7, p<0,05). *Données non publiées.*

Il serait alors nécessaire de déterminer les stratégies les plus efficaces afin d'améliorer la réparation épithéliale bronchique déficiente chez les patients FK et ceci malgré la présence d'infection.

## 4.4 Stratégie permettant l'amélioration de la réparation en présence de PsaDM

### 4.4.1 Combinaison de correcteur et de potentiateur

Tel que détaillé auparavant, le correcteur VRT-325 est un outil moléculaire qui permet d'étudier la correction du CFTR, mais son utilisation en clinique n'est plus envisagée à cause d'effets secondaires possibles à long terme (144, 158). Pour plus de pertinence clinique, nous avons donc décidé d'utiliser le correcteur Vx-809, qui fait l'objet d'études cliniques actuellement. Cependant, ces études ont démontré que son potentiel bénéfique sur la fonction pulmonaire est restreint lorsqu'utilisé seul (141, 161). La potentialisation du CFTR-F508del associée à la correction par le Vx809 semble être une stratégie beaucoup plus efficace (142, 161) et une demande à la FDA a été déposée proposant un tel traitement pour les patients avec la mutation F508del. Nous avons donc effectué des études préliminaires avec l'utilisation du Vx-770 en combinaison avec le VRT-325 ou le Vx-809 en absence d'infection.

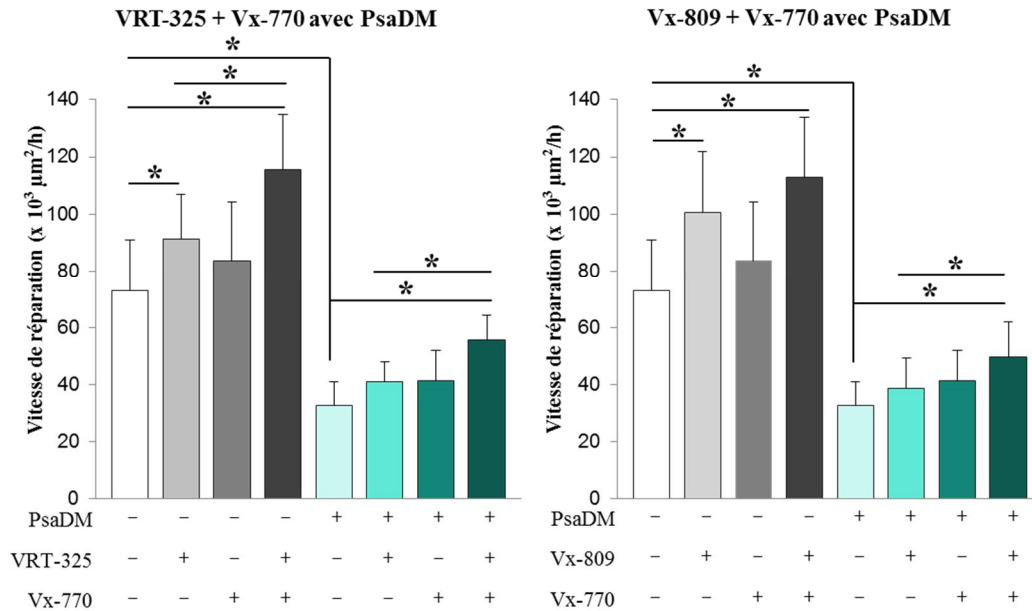


**FIGURE 22. Augmentation de la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK lors d'un traitement combiné d'un correcteur et d'un potentiateur.** La vitesse de réparation des plaies, calculée sur une période de 6h, est comparée en condition contrôle et en présence d'un correcteur (VRT-325, 5μM ou Vx-809, 5μM), d'un potentiateur (Vx-770, 1μM) ou la combinaison d'un correcteur et d'un potentiateur. (A; n=11, B; n=12, C; n=6, p<0,05). *Données non publiées.*

Les résultats montrent que la combinaison d'un correcteur et d'un potentiateur a un potentiel bénéfique plus important sur la réparation épithéliale comparativement à l'utilisation de la molécule correctrice seule, autant dans les lignées cellulaires que dans les cellules primaires des voies aériennes FK. Cet effet additionnel est encore plus marqué pour le Vx-809. Nos expériences montrent que cette stratégie semble efficace pour la mutation F508del avec diverses combinaisons de mutations de classe II-III-IV. Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus dans les essais cliniques montrant une plus grande amélioration de la fonction pulmonaire avec la combinaison de traitements. Il est possible de penser que l'augmentation de la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  qui entraîne la diminution des exacerbations des patients traités avec le Vx-770 et le Vx-809 pourrait aussi permettre de favoriser la réparation de l'épithélium des voies aériennes.

Nous avons par la suite évalué la combinaison d'un potentiateur et d'un correcteur sur la réparation épithéliale en présence d'infection, vu son impact négatif sur la correction de CFTR.

### Cellules primaires humaines des voies aériennes FK



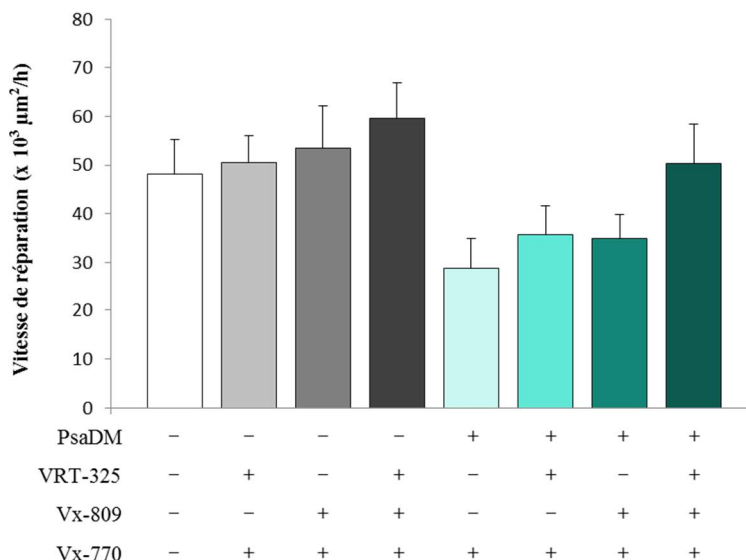
**FIGURE 23. Augmentation de la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK lors d'un traitement combiné d'un correcteur et d'un potentiateur en présence et en absence de PsaDM.** La vitesse de réparation des plaies, calculée sur une période de 6h, est comparée en condition contrôle et en présence d'un correcteur (VRT-325, 5µM ou Vx-809, 5µM), un potentiateur (Vx-770, 1uM) ou la combinaison d'un correcteur et d'un potentiateur en présence ou non de PsaDM (n=7, p<0,05). *Données non publiées.*

Nos résultats confirment bien un retard de la réparation induit par l'exposition au PsaDM. De plus, les correcteurs ne renversent pas la totalité de l'effet néfaste provoqué par l'infection bactérienne. Cependant, une amélioration significative de la réparation est retrouvée après la correction et la potentialisation du CFTR F508del/mutation de classe II-III-IV. Le niveau de réparation en présence d'un co-traitement du correcteur et du potentiateur est toutefois beaucoup plus faible que celui observé en absence d'infection. Le mécanisme par lequel le PsaDM interagit avec la correction n'est pas élucidé, mais nous explorons plusieurs pistes impliquant différents facteurs de virulences.

Dans l'optique d'une correction maximale du CFTR F508del, l'option proposée par plusieurs groupes de recherche est la combinaison de plusieurs correcteurs (165, 177).

#### 4.4.2 Combinaison de correcteurs

Les travaux de plusieurs groupes (137) démontrent que l'action combinée de différents correcteurs (154), dont la combinaison du VRT-325 et du Vx-809, permette un effet additif sur la maturation du CFTR muté (147). Nous avons donc voulu déterminer si l'action de ces deux correcteurs pouvait améliorer la réparation et renverser l'impact du PsaDM.

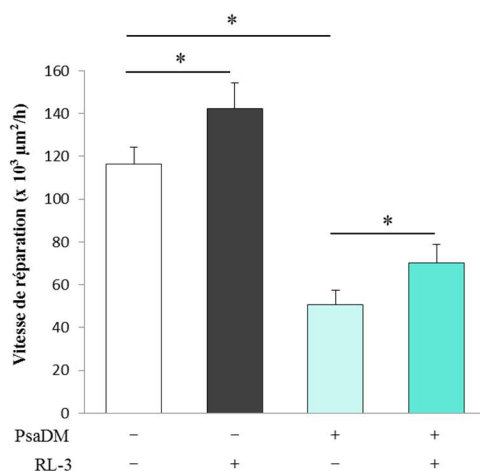


**FIGURE 24. Impact d'un traitement combiné avec le VRT-325, le Vx-809 et le Vx-770 sur la vitesse de réparation des monocouches de cellules des voies aériennes FK en présence et en absence de PsaDM.** La vitesse de réparation des plaies, calculée sur une période de 6h, est comparée en condition contrôle ou en présence de PsaDM seule ou en combinaison avec du VRT-325 + Vx-770, Vx-809 + Vx-770 ou du VRT-325 + Vx-809 + Vx-770 (suivant des prétraitements de 24h avant les plaies) (n=4). *Données non publiées.*

L'utilisation concomitante de correcteurs et potentiateurs, pour acheminer du CFTR à la membrane plasmique des patients FK et l'activer, permet non seulement d'augmenter le courant CFTR, mais aussi pourrait permettre une amélioration de la réparation épithéliale bronchique déficiente chez ces patients. Ainsi, nos résultats préliminaires, présentés à la figure 24, sont encourageants, bien que les bienfaits de la correction ne soient pas aussi importants que ceux obtenus en absence d'infection.

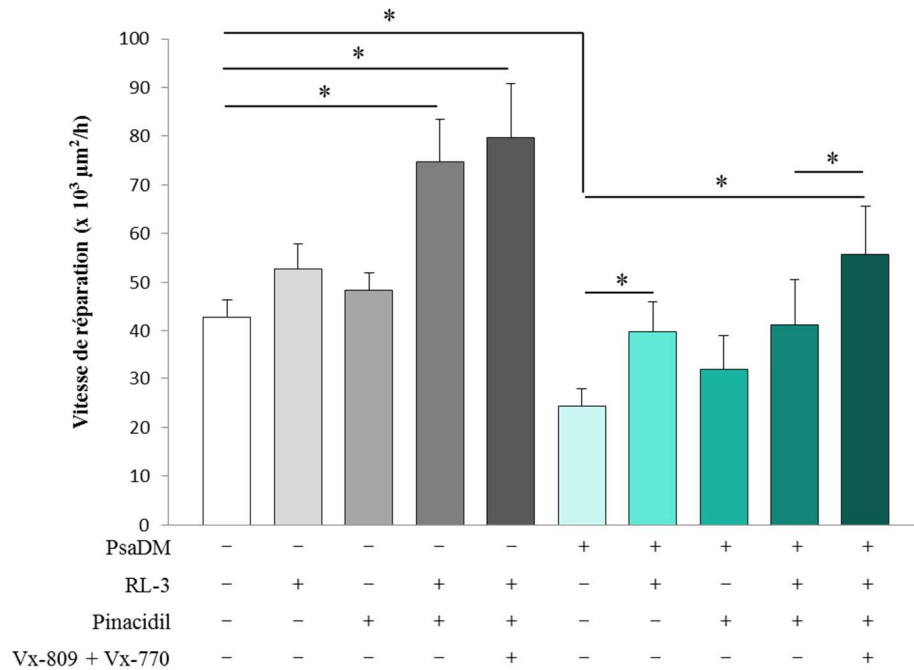
#### 4.4.3 Combinaison de correcteurs, potentiateur et activateurs des canaux K<sup>+</sup>

Des études antérieures du laboratoire (100, 172), ainsi que la revue récemment publiée de Girault *et al.* (98) décrivent l'implication des canaux K<sup>+</sup> dans la réparation épithéliale. Nos résultats préliminaires indiquent aussi que l'expression des canaux KvLQT1 ne semble pas altérée par une exposition au PsaDM (Figure 19). Ces canaux pourraient donc être une cible intéressante en présence d'infection pour favoriser la réparation épithéliale.



**FIGURE 25. Impact de la modulation du KvLQT1 en absence et en présence de PsaDM.** La vitesse de réparation des plaies, calculée sur une période de 6h, est comparée en condition contrôle ou en présence de PsaDM seul ou en combinaison avec un activateur du KvLQT1 (RL-3, 4 $\mu\text{M}$ ), suivant un traitement de 24h avant les plaies (n=11, p<0,05). *Données non publiées.*

En effet, l'activation du canal potassique KvLQT1 entraîne une stimulation de la réparation malgré la présence d'exoproduits de *P. aeruginosa* (Figure 25). Suite à ces résultats encourageants, nous avons décidé de tester la combinaison d'un activateur du canal KvLQT1 et d'un autre canal K<sup>+</sup>, le canal K<sub>ATP</sub> aussi impliqué dans la réparation épithéliale, en présence ou non d'un correcteur et d'un potentiateur sur les cellules primaires humaines FK.



**FIGURE 26. Impact de la correction/potentialisation du CFTR en combinaison avec des activateurs des canaux  $K^+$  sur la réparation épithéliale des cellules humaines primaires des voies aériennes, en présence de PsaDM.** La vitesse de réparation des plaies, calculée sur une période de 6h, est comparée en condition contrôle ou en présence de PsaDM seul ou en combinaison avec le Vx-809+Vx-770, le RL-3 4 $\mu$ M (activateur de KvLQT1), le pinacidil 100  $\mu$ M (activateur du  $K_{ATP}$ ) ou avec du Vx-809 + Vx-770 + pinacidil + RL-3 (suivant des prétraitements de 24h avant les plaies) (n=8, p<0,05). *Données non publiées.*

Tel qu'observé à la figure 26, nos travaux préliminaires sur l'utilisation d'activateurs des canaux  $K^+$  combinée à la correction du CFTR en présence d'infection semble une stratégie prometteuse et efficace afin d'améliorer la réparation épithéliale FK. La poursuite de cette étude devrait permettre d'établir le réel potentiel d'une telle stratégie sur la réparation. De plus, la sécrétion de  $Cl^-$  étant dépendante des canaux  $K^+$ , l'augmentation de l'activité des canaux  $K^+$  pourrait également faciliter la sécrétion de  $Cl^-$  et ainsi augmenter la clairance mucociliaire des patients FK.

Plusieurs études montrent que la correction du CFTR est très variable en fonction des types cellulaires et des patients. De plus, certaines mutations ne répondent pas bien aux correcteurs. Nous pensons donc qu'une stratégie alternative ciblant les canaux potassiques pourrait être intéressante. Toutefois, nous sommes conscients que les canaux potassiques sont



exprimés dans de nombreux types cellulaires et l'activation de certains canaux pourrait avoir des effets secondaires dans la fonction d'autres organes. Dans l'éventualité où cette stratégie pourrait être envisagée pour les patients, une administration locale, par inhalation, des modulateurs des canaux  $K^+$  pourrait en limiter les effets secondaires.

## **4.5 Limitations expérimentales**

### **4.5.1 Modèle d'hyperglycémie**

Le modèle d'hyperglycémie choisi, utilisé dans plusieurs autres études, est réalisé en utilisant une concentration de glucose 5 fois supérieure (25 mM) à celle présente dans le milieu de culture normal (5mM). Comme les concentrations de glucose peuvent atteindre 10 fois la valeur normale dans les voies aériennes diabétiques (168), il nous a semblé justifié d'utiliser une concentration 5 fois plus importante dans nos milieux de culture. De plus, de façon à contrôler l'osmolarité entre les deux milieux, nous avons pris soin d'ajouter 20mM de mannitol pour la condition contrôle (122, 124, 126, 128).

Dans nos travaux, nous avons utilisé des temps d'expositions aux fortes concentrations de glucose variables. La majorité des expériences a été effectuée après 24h d'exposition mais nous avons aussi effectué des traitements prolongés, soit de 48h ou pendant les 8 jours de culture, afin de mimer une exposition chronique. Bien qu'une exposition prolongée puisse creuser l'écart entre la condition contrôle et hyperglycémique comme c'est le cas de nos résultats sur la réparation épithéliale, certains effets sont déjà évidents après seulement 24h d'exposition. Chez les patients FK, des anomalies du glucose peuvent être présentes avant l'âge de 10 ans, entraînant une exposition à des niveaux de glucose anormaux de façon chronique et donc la mise en place de possibles mécanismes d'adaptation des cellules épithéliales à leur environnement (26). Cependant, il est très difficile de reproduire la condition physiopathologique du diabète/hyperglycémie telle qu'elle est présente dans l'organisme. En effet, la concentration de glucose des patients CFRD est variable au cours de la journée : elle est élevée après les repas et un retour à des valeurs normales plus lent est observé. De plus, des études ont démontré que les fluctuations de glucose, c'est-à-dire des périodes où les cellules sont exposées à de fortes concentrations suivies d'un retour à la

normale, semblent plus dommageables et induisent davantage d'apoptose que lorsque celles-ci sont en présence constantes de grande concentration de glucose (178). Ainsi, il aurait été intéressant d'étudier l'effet de variations cycliques de la concentration en glucose pendant la culture cellulaire.

#### **4.5.2 Modèles cellulaires utilisés**

Dans nos études, nous avons d'abord choisi d'évaluer nos hypothèses dans des lignées cellulaires. Premièrement, nous avons utilisé une lignée humaine épithéliale bronchique, les cellules CFBE-wt qui surexpriment le CFTR-WT, et les cellules CFBE- $\Delta$ F508 (homozygote pour la mutation F508del) qui surexpriment le CFTR-F508del. Ces 2 lignées ont été développées à partir de cellules épithéliales humaines d'un patient FK et elles présentent donc l'avantage d'avoir le même patrimoine génétique (146). Elles permettent de comparer des cellules similaires, exprimant soit le CFTR-WT, soit le CFTR muté F508del. De plus, la surexpression du CFTR-F508del permet d'observer plus facilement une maturation du canal par les correcteurs, ce qui en fait un modèle de choix pour de nombreuses équipes étudiant ces molécules et les mécanismes impliqués. Néanmoins, cette surexpression du CFTR muté de façon artificielle apporte nécessairement un biais dans les expériences. Ainsi, les CFBE sont très utiles d'un point de vue mécanistique, mais moins d'un point de vue clinique.

Deuxièmement, nous avons utilisé des lignées cellulaires produites par l'Université de l'Iowa. Les CuFi-1 et 4 sont issues de poumons de patients FK porteurs des mutations F508del homozygotes et F508del/G551D respectivement (179). Ces lignées ont été utilisées pour tester les différents correcteurs, potentiateurs et les combinaisons de ces composés sur ces deux types de mutations. Comme ces lignées sont directement issues de patient FK et ne surexpriment pas le CFTR, elles sont un meilleur modèle pour étudier la correction. Toutefois, les lignées cellulaires sont par définition des cellules immortalisées et au fil des passages, des changements tant au niveau génétique, phénotypique (180) qu'au niveau de l'expression de CFTR (179) peuvent avoir lieu. De plus, elles ne permettent pas de recréer un épithélium complètement différencié, avec les différents types cellulaires normalement présents au niveau des voies aériennes.

Nous avons donc jugé important dans nos études de confirmer nos résultats dans des cellules épithéliales primaires de voies aériennes nasales collectées chez des patients non-FK et FK ainsi que de poumons transplantés de patient FK. Les cellules nasales de polypes sont utilisées et reconnues comme un modèle *in vitro* représentant l'épithélium des voies aériennes *in vivo*. Dans nos études, les patients non-FK peuvent parfois être des patients avec d'autres pathologies associées à la polypose naso-sinusienne telles que l'asthme et la sinusite chronique avec un statut tabagique plus ou moins prononcé. Ces facteurs peuvent diminuer l'expression du CFTR (181, 182) ; l'impact que nous avons observé sur les cellules non-FK pourrait donc être sous-estimé. Nous commençons donc à collecter lors de chirurgies à l'hypophyse des spécimens de sujets contrôles, qui ne présentent pas de pathologie respiratoire. D'autre part, dans nos études, les patients non-FK à partir desquels nous obtenons les cellules sont généralement plus âgés (clinique pour adulte) que les patients FK (cliniques pour adulte et enfant). Cette différence pourrait donc entraîner d'autres disparités entre nos modèles. Nous avons donc commencé à développer des procédures de brossage nasal, qui nous permettront de recruter des sujets contrôles sans pathologie et des patients FK, avec une même répartition dans nos groupes en termes d'âge et de sexe. Pour ce qui est des cellules bronchiques issues de poumons de patients FK transplantés, la dose massive d'antibiotique afin d'éradiquer l'infection dans nos cultures pourrait aussi influencer les résultats. De plus, les patients FK transplantés ont des poumons présentant des dommages et un remodelage sévères, ce qui peut aussi biaiser les résultats (79). Cependant, ceci constitue aussi une force de notre modèle puisque des stratégies permettant d'améliorer la réparation de façon efficace, malgré une pathologie avancée, sont d'autant plus intéressantes et encourageantes cliniquement.

Malgré les possibles limitations liées à nos sujets et patients, les cellules primaires ont l'avantage de se différencier en un épithélium des voies aériennes comprenant les différents types cellulaires : cellules basales, caliciformes et ciliées, recréant un épithélium ayant une structure similaire à celle présente *in vivo*. Elles représentent actuellement le « gold standard » pour les études sur les correcteurs.

### 4.5.3 Modèle de plaies mécaniques

Le modèle que nous avons utilisé pour étudier les phénomènes de réparation épithéliale précoces est un modèle en deux dimensions. En effet, nous avons effectué nos plaies sur des monocouches de cellules épithéliales en lignées ou primaires humaines cultivées sur plastique. Les étapes que l'on retrouve dans la Figure 9 (p.25) ne sont donc pas toutes respectées. En effet, les cellules sur support plastique ne sont pas différenciées et la réparation que nous étudions fait intervenir surtout deux phénomènes : la migration et la prolifération cellulaire.

Tel que précisé ci-dessus, la différenciation des cellules primaires humaines en interface air/liquide est possible et permet de recréer une structure ayant de grandes similarités avec l'épithélium pulmonaire bronchique. Ce modèle permet de mieux étudier la réparation et la régénération épithéliale *in vitro* (schéma complet de la Figure 9). Les cellules différenciées utilisent deux processus de réparation, l'un faisant intervenir l'étalement des cellules isolées, et l'autre permettant le mouvement de feuillets cellulaires. De plus, les processus de réparation/régénération en 3D sont plus complexes et le temps nécessaire afin de retrouver un épithélium résistant, différencié et fonctionnel est plus long suite aux lésions, que dans nos modèles en 2D. Plusieurs approches ont été développées afin d'effectuer ce genre de plaies mécaniques sur des cellules sur filtres différenciées en IAL. Dans nos expériences, le nombre de molécules et de conditions ainsi que la durée de culture en IAL (40 jours environ) restreint l'utilisation de cette approche. Nous avons toutefois débuté au laboratoire ce type d'expériences sur filtres avec un suivi en vidéo-microscopie et il sera intéressant de tester les hypothèses les plus prometteuses sur ces cultures en 3D. De plus, elles permettraient de tester l'effet de traitements chroniques, sur de longues périodes de temps, se rapprochant ainsi des conditions physiologiques.

Finalement, nos différents modèles couvrent seulement une partie de l'épithélium des voies aériennes. En effet, l'épithélium nasal ou bronchique est différent de l'épithélium bronchiolaire ainsi que de l'épithélium alvéolaire. De plus, ils ne tiennent pas compte de l'organisme entier, des facteurs sécrétés dans le sang et de l'inflammation systémique. L'utilisation de co-cultures, comprenant des cellules épithéliales et des cellules immunitaires par exemple serait donc pertinent. Nous envisageons d'implémenter de telles approches au laboratoire bientôt.

Évidemment, il serait crucial de pouvoir valider nos hypothèses dans des modèles *in vivo*. Toutefois, les modèles de souris transgéniques FK ne reflètent pas la maladie pulmonaire caractéristique de la pathologie FK. À l'heure actuelle, deux espèces animales ont été développées et correspondent davantage au phénotype FK : le cochon et le furet. Il serait donc intéressant d'étudier la régénération épithéliale dans ces modèles animaux. Dans le cochon CFTR<sup>-/-</sup> et F508del/F508del, des anomalies sont apparentes au niveau pulmonaire (183). Toutefois, ce modèle reste très dispendieux.

#### 4.5.4 Modèle d'infection

Pour étudier la composante infectieuse, nous avons utilisé des filtrats bactériens de *P. aeruginosa*, contenant les produits sécrétés par celle-ci, tandis que les bactéries vivantes sont éliminées grâce à la filtration. Nous avons choisi d'exposer les cellules épithéliales à ces produits pendant une période de 24h avant les expérimentations.

Ces filtrats bactériens contiennent les facteurs de virulences, protéases et élastases, sécrétés pendant l'infection bactérienne. Cependant, pendant la croissance bactérienne (i.e. 72h, correspondant à la phase stationnaire tardive), certaines bactéries vont entrer en apoptose ou en nécrose, libérant des facteurs de mort cellulaire qui vont aussi se retrouver dans le filtrat. De plus, des temps prolongés de culture bactérienne peuvent modifier les profils d'expression des protéases par rapport à des cultures en phase exponentielle ou stationnaire précoce. Finalement, nous avons choisi un mode de culture planctonique mais les bactéries peuvent former des biofilms lorsque l'infection chronique est établie chez les patients FK. Les résultats que nous avons observés peuvent donc être influencés par ces différentes composantes et ainsi ne pas représenter la réalité. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de filtrat bactérien préparé après un temps de culture plus court ainsi que des modes de croissance en biofilm.

Le temps d'exposition aux filtrats bactériens influence grandement les résultats. En effet, il a été rapporté que l'effet de *P. aeruginosa* sur la réparation épithéliale était moins important si l'infection était présente seulement au moment où la monocouche est lésée (106). De plus, les facteurs de virulences ont des effets temps-dépendants. Par exemple, le LPS diminue l'activité du CFTR dans une première phase, pour ensuite l'augmenter dans une seconde phase (74), tandis que la flagelline stimule la sécrétion de Cl<sup>-</sup> lorsqu'elle est présente

pendant une période courte (de 5 à 45 minutes). La concentration de PsaDM ou de certains de ces exoproduits peut aussi influencer la réponse cellulaire (175, 184, 185). Enfin, certaines études suggèrent que la présence de bactéries vivantes est nécessaire pour inhiber la réparation (106), contrairement à ce que nous avons obtenu. Dans toutes ces études, différentes souches de *P. aeruginosa* sont utilisées (69, 74, 108, 184), ce qui peut aussi expliquer les divergences de résultats obtenus. La réponse des cellules épithéliales semble donc très dépendante de la durée d'exposition aux exoproduits, de la souche bactérienne et de la concentration.

Le modèle le plus représentatif de la réalité physiopathologique est plutôt difficile à reproduire *in vitro*. Certaines équipes soutiennent que l'infection est située dans la lumière des voies aériennes et repose sur la couche de mucus au-dessus du PCL. Ainsi, les bactéries ne seraient pas en contact direct avec les cellules épithéliales (186), ce qui justifie l'utilisation de filtrats bactériens. Cependant, *P. aeruginosa* lie préférentiellement l'épithélium lésé (51). L'utilisation des bactéries vivantes en contact avec nos cultures aurait donc aussi été appropriée. Par contre, le contact direct de *P. aeruginosa in vitro* est souvent toxique pour les cellules, rendant cette approche difficilement réalisable sur une période prolongée. Or, les patients FK sont en contact constant avec ces nombreux produits bactériens. Il serait donc pertinent et intéressant de regarder des expositions aux exoproduits de *P. aeruginosa* sur la différenciation/régénération de l'épithélium en culture air/liquide sur une longue période. De plus, il serait intéressant de mettre en place des modèles où la bactérie vivante serait impliquée, sur des co-cultures de cellules épithéliales et immunitaires. Nous pourrions aussi envisager l'utilisation de modèles *in vivo*.

L'infection par *P. aeruginosa* est la plus importante au niveau des patients FK, mais d'autres bactéries peuvent aussi être présentes. Les données de Zahm *et al.* 2010 (187) ont montré que le transport ionique est fortement affecté par *S. aureus* et ce pathogène pourrait aussi diminuer la réparation épithéliale bronchique. Il serait important d'étudier l'impact d'autres bactéries dans l'épithélium des voies aériennes FK. Toutefois, l'infection chez ces patients est complexe et les interactions entre les microorganismes sont multiples et rendent la réalisation du modèle idéal difficile.

#### 4.5.5 Molécules correctrices et potentiatrice utilisées

Dans notre étude, nous avons utilisé deux correcteurs : le VRT-325 et le Vx-809. Néanmoins, le VRT-325 a des effets possibles non-spécifiques sur le canal hERG (149) et il semble inhiber le canal CFTR à de fortes concentrations (158). Il est cependant reconnu comme un bon correcteur et il est fort utilisé comme preuve de concept (158).

Le Vx-809 sera probablement le premier correcteur à être approuvé en clinique en combinaison avec le Vx-770, puisqu'une demande d'approbation a récemment été déposée à la FDA. Il est donc un choix pertinent. Par contre, sa faible capacité de correction laisse penser qu'il serait pertinent de développer de nouvelles molécules correctrices plus efficaces.

Le Vx-770 est le seul potentiateur accepté comme traitement des patients FK avec des mutations de classe III. La combinaison de ce potentiateur avec le correcteur Vx-809 pourrait être la première thérapie corrigeant le défaut de CFTR des patients FK F508del homozygote. Nous avons donc privilégié ces molécules pour nos études de combinaisons.

Dans nos travaux, la majorité des traitements par le correcteur est faite 24h avant les expérimentations afin de permettre une correction du CFTR F508del et le potentiateur est appliqué seulement 1h avant les lésions. Dans une optique minant la clinique, ces composés devraient être utilisés de manière chronique *in vitro*. Cependant, il est à noter que les études de Cholon *et al.* 2014 (188) ainsi que Veit *et al.* 2014 (189) rapportent une diminution de la correction par le Vx-809 lorsqu'il est combiné au Vx-770 pour une période de plus de 24h. Une telle limitation devra donc être évaluée dans le futur chez les patients FK.

#### 4.6 Perspectives

La régénération épithéliale est primordiale chez les patients FK afin restaurer l'intégrité et la fonction pulmonaire. Suite à nos études, plusieurs avenues de recherche pourraient être développées, tel que résumé ci-dessous.

Tout d'abord, de nouvelles expériences sont nécessaires afin de compléter notre étude sur l'impact de *P. aeruginosa* sur le CFTR. En fait, différentes souches de mutant de *P. aeruginosa* sont déjà utilisées au laboratoire afin de déterminer quelle(s) composante(s) du filtrat bactérien est(sont) responsable(s) de cet effet délétère. De plus, il est essentiel de

déterminer le mécanisme responsable de cet effet délétère sur le CFTR-WT et le CFTR-F508del afin d'identifier des stratégies interférant avec l'infection et développer des correcteurs capable de corriger efficacement le CFTR muté en présence d'infection. Enfin, les études *in vitro* de screening de molécules correctrices et potentiatrices pourraient être réalisées en présence d'infection afin d'estimer son impact sur la correction fonctionnelle de CFTR.

D'autre part, les processus de réparation épithéliale méritent de plus amples investigations. Au laboratoire, des études se poursuivent afin de déterminer quelle(s) composante(s) du PsaDM est responsable de l'effet délétère sur la réparation. Les mécanismes qui permettent ce ralentissement de la réparation sont aussi importants et doivent être étudiés.

De plus, nous pensons que comprendre les mécanismes impliqués à la fois dans l'inhibition de la réparation par *P. aeruginosa* et dans l'augmentation de la réparation par les combinaisons utilisées de correcteurs et activateurs permettra l'élaboration des stratégies plus efficaces.

Comme discuté dans la section des limitations expérimentales, l'utilisation de cultures différenciées permettra d'étudier les phénomènes de réparation de manière plus complète et complexe. Au laboratoire, nous avons déjà débuté ces expérimentations. De plus, ces cultures permettront de mieux comprendre l'effet de la correction et de l'infection sur la régénération épithéliale (cilliogénèse, différenciation, polarisation). Enfin, l'élaboration de co-cultures de cellules épithéliales différenciées et de cellules immunitaires permettrait d'intégrer dans un même modèle la composante inflammatoire et immunitaire, afin de refléter davantage une situation physiopathologique.

Évidemment, puisque plusieurs autres bactéries sont impliquées dans la pathologie FK et il serait intéressant d'investiguer l'impact des autres pathogènes sur le CFTR et sur la réparation épithéliale. Dans cette optique, des expériences préliminaires ont été entreprises en présence de *S. aureus*, puisque cette bactérie est la deuxième plus importante au niveau pulmonaire chez les patients FK.

Finalement, il serait intéressant de poursuivre nos études sur l'hyperglycémie afin de bien comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la réparation et des courants afin de déterminer leur réel impact sur la fonction pulmonaire.



Évidemment, ceci ne représente qu'une partie des nombreux développements possibles, et beaucoup de travail reste à faire, compte tenu de l'étendue des questions sans réponse.

## Chapitre 5; Conclusion

La première partie de mon projet de maîtrise a permis d'établir que le transport ionique ainsi que la réparation épithéliale bronchique, deux fonctions primordiales de l'épithélium, sont affectés par l'hyperglycémie. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, le déclin de la fonction pulmonaire observé chez les patients diabétiques. De plus, nous avons démontré que l'effet bénéfique des correcteurs du CFTR sur la réparation épithéliale bronchique FK était réduit suite à une exposition à des concentrations de glucose élevées. Cependant, la correction de la fonction du CFTR ne semble pas affectée. Des expérimentations sont nécessaires afin d'élucider ce mécanisme.

La deuxième partie de mes études a permis d'établir que l'expression et la fonction de CFTR étaient sévèrement altérées par les exoproduits de *P. aeruginosa*. Les mécanismes responsables de cette diminution semblent être post-traductionnels, mais de plus amples investigations sont nécessaires pour établir les mécanismes précis et les produits bactériens impliqués. Finalement, nous avons démontré pour la première fois un effet délétère *P. aeruginosa* sur la maturation du CFTR ainsi que le rétablissement de sa fonction par le correcteur VRT-325.

Ces deux études montrent que l'infection et le diabète, qui sont deux composantes critiques de la pathologie de la fibrose kystique, pourraient affecter et aggraver davantage le transport ionique par le CFTR et la réparation épithéliale qui sont déjà déficients en FK. De plus, les thérapies envisagées par les molécules correctrices pourraient-être affectées par ces deux aspects de la pathologie. Nos études montrent donc l'importance de bien gérer la glycémie des patients ainsi que les infections afin de permettre le plein potentiel des molécules correctrices et permettre le retour d'une clairance mucociliaire efficace.

## Bibliographie

1. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;145:19-34.
2. Burgel PR, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, et al. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *The European respiratory journal*. 2015.
3. Galiotta LJ. Managing the underlying cause of cystic fibrosis: a future role for potentiators and correctors. *Paediatric drugs*. 2013;15(5):393-402.
4. Knipping S, Holzhausen HJ, Riederer A, Bloching M. Cystic fibrosis: ultrastructural changes of nasal mucosa. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2007;264(12):1413-8.
5. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.
6. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80.
7. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989;245(4922):1059-65.
8. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet*. 2008;372(9636):415-7.
9. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(5):475-82.
10. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Annals of human genetics*. 2003;67(Pt 5):471-85.
11. Lommatzsch ST, Aris R. Genetics of cystic fibrosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2009;30(5):531-8.
12. Kerem E, Viviani L, Zolin A, MacNeill S, Hatziaorou E, Ellemunter H, et al. Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *The European respiratory journal*. 2014;43(1):125-33.
13. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical biochemistry*. 2012;45(15):1132-44.
14. Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, et al. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(4):1422-31.
15. Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science*. 1991;251(4994):679-82.
16. Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*. 1992;68(4):809-18.
17. Linsdell P. Functional architecture of the CFTR chloride channel. *Molecular membrane biology*. 2014;31(1):1-16.
18. Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*. 1991;67(4):775-84.

19. Linsdell P. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel blockers: Pharmacological, biophysical and physiological relevance. *World journal of biological chemistry*. 2014;5(1):26-39.
20. Devidas S, Guggino WB. CFTR: domains, structure, and function. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1997;29(5):443-51.
21. Kim SJ, Skach WR. Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:201.
22. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annual review of biochemistry*. 2008;77:701-26.
23. Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, Riordan JR. Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(37):39051-7.
24. Pasyk S, Molinski S, Ahmadi S, Ramjeesingh M, Huan LJ, Chin S, et al. The major cystic fibrosis causing mutation exhibits defective propensity for phosphorylation. *Proteomics*. 2015;15(2-3):447-61.
25. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*. 2011;139(6):1480-90.
26. Barrio R. Management of endocrine disease: Cystic fibrosis-related diabetes: novel pathogenic insights opening new therapeutic avenues. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2015;172(4):R131-41.
27. Quintana-Gallego E, Delgado-Pecellin I, Calero Acuna C. CFTR protein repair therapy in cystic fibrosis. *Archivos de bronconeumologia*. 2014;50(4):146-50.
28. Thelin WR, Boucher RC. The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7(3):290-5.
29. Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, et al. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nature genetics*. 1992;2(3):240-8.
30. Kreda SM, Mall M, Mengos A, Rochelle L, Yankaskas J, Riordan JR, et al. Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(5):2154-67.
31. Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. [Repair and regeneration of the airway epithelium]. *Medecine sciences : M/S*. 2005;21(12):1063-9.
32. Proud D. *The pulmonary epithelium in health and disease*. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2008. xvii, 441 p. p.
33. Bardou O, Trinh NT, Brochiero E. Molecular diversity and function of K<sup>+</sup> channels in airway and alveolar epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296(2):L145-55.
34. Livraghi A, Randell SH. Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicologic pathology*. 2007;35(1):116-29.
35. Devor DC, Singh AK, Lambert LC, DeLuca A, Frizzell RA, Bridges RJ. Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *The Journal of general physiology*. 1999;113(5):743-60.
36. Stecenko AA, Moran A. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2010;16(6):611-5.

37. Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2003;445(4):495-8.
38. Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:174306.
39. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2003;9(6):486-91.
40. Collawn JF, Matalon S. CFTR and lung homeostasis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;307(12):L917-23.
41. Kunzelmann K, Schreiber R, Nitschke R, Mall M. Control of epithelial Na<sup>+</sup> conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2000;440(2):193-201.
42. Munkholm M, Mortensen J. Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clinical physiology and functional imaging*. 2014;34(3):171-7.
43. Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science*. 2012;337(6097):937-41.
44. Rackley CR, Stripp BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(8):2724-30.
45. Hiemstra PS, McCray PB, Jr., Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *The European respiratory journal*. 2015;45(4):1150-62.
46. de Bentzmann S, Roger P, Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *The European respiratory journal*. 1996;9(10):2145-50.
47. Tang AC, Turvey SE, Alves MP, Regamey N, Tummler B, Hartl D. Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2014;23(133):320-32.
48. Ciofu O, Hansen CR, Hoiby N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2013;19(3):251-8.
49. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(4):1075-82.
50. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(12):841-51.
51. de Bentzmann S, Plotkowski C, Puchelle E. Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;154(4 Pt 2):S155-62.
52. Gomez MI, Prince A. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7(3):244-51.
53. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(22):8487-92.
54. Hurley MN, Camara M, Smyth AR. Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *The European respiratory journal*. 2012;40(4):1014-23.

55. Hansen SK, Rau MH, Johansen HK, Ciofu O, Jelsbak L, Yang L, et al. Evolution and diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in the paranasal sinuses of cystic fibrosis children have implications for chronic lung infection. *The ISME journal*. 2012;6(1):31-45.
56. Koch C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. *Pediatric pulmonology*. 2002;34(3):232-6.
57. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(11).
58. Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *The Laryngoscope*. 2009;119(7):1406-11.
59. Van Ewijk BE, Wolfs TF, Aerts PC, Van Kessel KP, Fleer A, Kimpen JL, et al. RSV mediates *Pseudomonas aeruginosa* binding to cystic fibrosis and normal epithelial cells. *Pediatric research*. 2007;61(4):398-403.
60. Roger P, Puchelle E, Bajolet-Laudinat O, Tournier JM, Debordeaux C, Plotkowski MC, et al. Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *The European respiratory journal*. 1999;13(6):1301-9.
61. Plotkowski MC, de Bentzmann S, Pereira SH, Zahm JM, Bajolet-Laudinat O, Roger P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1999;20(5):880-90.
62. Fleiszig SM, Evans DJ, Do N, Vallas V, Shin S, Mostov KE. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infection and immunity*. 1997;65(7):2861-7.
63. Fleiszig SM, Vallas V, Jun CH, Mok L, Balkovetz DF, Roth MG, et al. Susceptibility of epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity is upregulated by hepatocyte growth factor. *Infection and immunity*. 1998;66(7):3443-6.
64. Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, et al. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *Journal of immunology*. 2005;174(6):3643-9.
65. Wilson R, Sykes DA, Watson D, Rutman A, Taylor GW, Cole PJ. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infection and immunity*. 1988;56(9):2515-7.
66. Munro NC, Barker A, Rutman A, Taylor G, Watson D, McDonald-Gibson WJ, et al. Effect of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine on in vivo tracheal mucus velocity. *Journal of applied physiology*. 1989;67(1):316-23.
67. McDermott C, Chess-Williams R, Grant GD, Perkins AV, McFarland AJ, Davey AK, et al. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin on human urothelial cell function and viability. *The Journal of urology*. 2012;187(3):1087-93.
68. Muller M. Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Free radical biology & medicine*. 2006;41(11):1670-7.
69. Swiatecka-Urban A, Moreau-Marquis S, Maceachran DP, Connolly JP, Stanton CR, Su JR, et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;290(3):C862-72.
70. Bomberger JM, Ye S, Maceachran DP, Koeppen K, Barnaby RL, O'Toole GA, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. *PLoS pathogens*. 2011;7(3):e1001325.

71. MacEachran DP, Ye S, Bomberger JM, Hogan DA, Swiatecka-Urban A, Stanton BA, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infection and immunity*. 2007;75(8):3902-12.
72. Rubino R, Bezzetti V, Favia M, Facchini M, Tebon M, Singh AK, et al. *Pseudomonas aeruginosa* reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2014;466(12):2269-78.
73. Schwarzer C, Fischer H, Kim EJ, Barber KJ, Mills AD, Kurth MJ, et al. Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl<sup>-</sup> transport in human bronchial epithelial cells. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(12):1653-62.
74. Haenisch MD, Ciche TA, Luckie DB. *Pseudomonas* or LPS exposure alters CFTR iodide efflux in 2WT2 epithelial cells with time and dose dependence. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;394(4):1087-92.
75. Le Gars M, Descamps D, Roussel D, Saussereau E, Guillot L, Ruffin M, et al. Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(2):170-9.
76. Bebok Z, Varga K, Hicks JK, Venglarik CJ, Kovacs T, Chen L, et al. Reactive oxygen nitrogen species decrease cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and cAMP-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in airway epithelia. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(45):43041-9.
77. Harrington MA, Gunderson KL, Kopito RR. Redox reagents and divalent cations alter the kinetics of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(39):27536-44.
78. Meyerholz DK, Stoltz DA, Namati E, Ramachandran S, Pezzulo AA, Smith AR, et al. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(10):1251-61.
79. Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maille E, Adam D, Lingee S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *The European respiratory journal*. 2012;40(6):1390-400.
80. Sobonya RE, Taussig LM. Quantitative aspects of lung pathology in cystic fibrosis. *The American review of respiratory disease*. 1986;134(2):290-5.
81. Stick SM, Brennan S, Murray C, Douglas T, von Ungern-Sternberg BS, Garratt LW, et al. Bronchiectasis in infants and preschool children diagnosed with cystic fibrosis after newborn screening. *The Journal of pediatrics*. 2009;155(5):623-8 e1.
82. Piorunek T, Marszałek A, Biczysko W, Goździk J, Cofta S, Seget M. Correlation between the stage of cystic fibrosis and the level of morphological changes in adult patients. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2008;59 Suppl 6:565-72.
83. Kassim SY, Gharib SA, Mecham BH, Birkland TP, Parks WC, McGuire JK. Individual matrix metalloproteinases control distinct transcriptional responses in airway epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*. 2007;75(12):5640-50.
84. Shute J, Marshall L, Bodey K, Bush A. Growth factors in cystic fibrosis - when more is not enough. *Paediatric respiratory reviews*. 2003;4(2):120-7.

85. Azghani AO, Connelly JC, Peterson BT, Gray LD, Collins ML, Johnson AR. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* elastase on alveolar epithelial permeability in guinea pigs. *Infection and immunity*. 1990;58(2):433-8.
86. Chmiel JF, Konstan MW. Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clinics in chest medicine*. 2007;28(2):331-46.
87. Becker MN, Sauer MS, Muhlebach MS, Hirsh AJ, Wu Q, Verghese MW, et al. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(5):645-53.
88. Courtney JM, Ennis M, Elborn JS. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2004;3(4):223-31.
89. Pereira LC, Moreira EA, Bennemann GD, Moreno YM, Buss Zda S, Barbosa E, et al. Influence of inflammatory response, infection, and pulmonary function in cystic fibrosis. *Life sciences*. 2014;109(1):30-6.
90. Tang A, Sharma A, Jen R, Hirschfeld AF, Chilvers MA, Lavoie PM, et al. Inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production in humans with cystic fibrosis. *PloS one*. 2012;7(5):e37689.
91. Borgatti M, Bezzetti V, Mancini I, Nicolis E, Dechecchi MC, Lampronti I, et al. Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;357(4):977-83.
92. Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, et al. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clinical and experimental immunology*. 2001;124(1):69-76.
93. Kube D, Sontich U, Fletcher D, Davis PB. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;280(3):L493-502.
94. Zahm JM, Chevillard M, Puchelle E. Wound repair of human surface respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1991;5(3):242-8.
95. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;298(6):L715-31.
96. Coraux C, Roux J, Jolly T, Birembaut P. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(6):689-94.
97. Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiological reviews*. 2012;92(4):1865-913.
98. Girault A, Brochiero E. Evidence of K<sup>+</sup> channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *American journal of physiology Cell physiology*. 2014;306(4):C307-19.
99. White SR, Dorscheid DR, Rabe KF, Wojcik KR, Hamann KJ. Role of very late adhesion integrins in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers after mechanical injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1999;20(4):787-96.
100. Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(5):L866-80.



101. Ruffin M, Volland M, Marie S, Bonora M, Blanchard E, Blouquit-Laye S, et al. Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(12):2340-51.
102. Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;299(5):C912-21.
103. Adam D, Roux-Delrieu J, Luczka E, Bonnomet A, Lesage J, Merol JC, et al. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. *The Journal of pathology*. 2015;235(3):408-19.
104. Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *The Journal of pathology*. 2007;211(3):340-50.
105. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in chronic wounds. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2008;16(1):37-44.
106. Geiser TK, Kazmierczak BI, Garrity-Ryan LK, Matthay MA, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cellular microbiology*. 2001;3(4):223-36.
107. Muller M, Li Z, Maitz PK. *Pseudomonas pyocyanin* inhibits wound repair by inducing premature cellular senescence: role for p38 mitogen-activated protein kinase. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2009;35(4):500-8.
108. de Bentzmann S, Polette M, Zahm JM, Hinnrasky J, Kileztky C, Bajolet O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(2):209-19.
109. Nathan BM, Laguna T, Moran A. Recent trends in cystic fibrosis-related diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2010;17(4):335-41.
110. O'Shea D, O'Connell J. Cystic fibrosis related diabetes. *Current diabetes reports*. 2014;14(8):511.
111. Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, Berthiaume Y, Poitout V, Prentki M, et al. Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2009;30(4):153-77.
112. Moran A, Becker D, Casella SJ, Gottlieb PA, Kirkman MS, Marshall BC, et al. Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis-related diabetes: a technical review. *Diabetes care*. 2010;33(12):2677-83.
113. Ntimbane T, Krishnamoorthy P, Huot C, Legault L, Jacob SV, Brunet S, et al. Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: a pilot study in children. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2008;7(5):373-84.
114. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE, Garg ML. Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001;20(2 Suppl):157-65.
115. Hanna RM, Weiner DJ. Overweight and obesity in patients with cystic fibrosis: a center-based analysis. *Pediatric pulmonology*. 2015;50(1):35-41.
116. Welsh L, Robertson CF, Ranganathan SC. Increased rate of lung function decline in Australian adolescents with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2014;49(9):873-7.

117. Garnett JP, Gray MA, Tarran R, Brodlie M, Ward C, Baker EH, et al. Elevated paracellular glucose flux across cystic fibrosis airway epithelial monolayers is an important factor for *Pseudomonas aeruginosa* growth. *PloS one*. 2013;8(10):e76283.
118. Milla CE, Warwick WJ, Moran A. Trends in pulmonary function in patients with cystic fibrosis correlate with the degree of glucose intolerance at baseline. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(3 Pt 1):891-5.
119. Leclercq A, Gauthier B, Rosner V, Weiss L, Moreau F, Constantinescu AA, et al. Early assessment of glucose abnormalities during continuous glucose monitoring associated with lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2014;13(4):478-84.
120. Widger J, Ranganathan S, Robinson PJ. Progression of structural lung disease on CT scans in children with cystic fibrosis related diabetes. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2013;12(3):216-21.
121. Zhang XJ, Meng C, Chinkes DL, Herndon DN. Beneficial effects of insulin on cell proliferation and protein metabolism in skin donor site wound. *The Journal of surgical research*. 2011;168(1):e155-61.
122. Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, Yu FS. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes*. 2009;58(5):1077-85.
123. Velander P, Theopold C, Hirsch T, Bleiziffer O, Zuhaili B, Fossum M, et al. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(2):288-93.
124. Lan CC, Wu CS, Kuo HY, Huang SM, Chen GS. Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes. *The British journal of dermatology*. 2009;160(6):1206-14.
125. Xu K, Yu FS. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(6):3301-8.
126. Chang H, Ma YG, Wang YY, Song Z, Li Q, Yang N, et al. High glucose alters apoptosis and proliferation in HEK293 cells by inhibition of cloned BK Ca channel. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(6):1660-75.
127. Gosmanov AR, Schneider EG, Thomason DB. NKCC activity restores muscle water during hyperosmotic challenge independent of insulin, ERK, and p38 MAPK. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;284(3):R655-65.
128. Chu KY, Cheng Q, Chen C, Au LS, Seto SW, Tuo Y, et al. Angiotensin II exerts glucose-dependent effects on Kv currents in mouse pancreatic beta-cells via angiotensin II type 2 receptors. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;298(2):C313-23.
129. Peters S. Cystic fibrosis: a review of pathophysiology and current treatment recommendations. *South Dakota medicine : the journal of the South Dakota State Medical Association*. 2014;67(4):148-51, 53.
130. Dhooghe B, Noel S, Huaux F, Leal T. Lung inflammation in cystic fibrosis: pathogenesis and novel therapies. *Clinical biochemistry*. 2014;47(7-8):539-46.
131. Zahm JM, Milliot M, Bresin A, Coraux C, Birembaut P. The effect of hyaluronan on airway mucus transport and airway epithelial barrier integrity: potential application to the

cytoprotection of airway tissue. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2011;30(7-8):389-95.

132. Waters V, Smyth A. Cystic fibrosis microbiology: Advances in antimicrobial therapy. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2015.

133. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2012;76(1):46-65.

134. Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2008;35(3):135-53.

135. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2015.

136. Cantin AM. Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2004;10(6):531-6.

137. Armstrong DK, Cunningham S, Davies JC, Alton EW. Gene therapy in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood*. 2014;99(5):465-8.

138. Lynch JP, 3rd, Sayah DM, Belperio JA, Weigt SS. Lung transplantation for cystic fibrosis: results, indications, complications, and controversies. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2015;36(2):299-320.

139. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(10):1262-72.

140. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, et al. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Respiratory medicine*. 2014;2(7):539-47.

141. Pettit RS, Fellner C. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. 2014;39(7):500-11.

142. Rowe SM, Verkman AS. Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(7).

143. Yu H, Burton B, Huang CJ, Worley J, Cao D, Johnson JP, Jr., et al. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2012;11(3):237-45.

144. Molinski S, Eckford PD, Pasyk S, Ahmadi S, Chin S, Bear CE. Functional Rescue of F508del-CFTR Using Small Molecule Correctors. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:160.

145. Birault V, Solari R, Hanrahan J, Thomas DY. Correctors of the basic trafficking defect of the mutant F508del-CFTR that causes cystic fibrosis. *Current opinion in chemical biology*. 2013;17(3):353-60.

146. Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, et al. Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *The Journal of physiology*. 2005;569(Pt 2):601-15.

147. Farinha CM, King-Underwood J, Sousa M, Correia AR, Henriques BJ, Roxo-Rosa M, et al. Revertants, low temperature, and correctors reveal the mechanism of F508del-CFTR rescue by VX-809 and suggest multiple agents for full correction. *Chemistry & biology*. 2013;20(7):943-55.

148. Van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, et al. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(6):L1117-30.
149. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(46):18843-8.
150. Farmen SL, Karp PH, Ng P, Palmer DJ, Koehler DR, Hu J, et al. Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl<sup>-</sup> transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;289(6):L1123-30.
151. Zhang L, Button B, Gabriel SE, Burkett S, Yan Y, Skiadopoulou MH, et al. CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS biology*. 2009;7(7):e1000155.
152. Chanoux RA, Rubenstein RC. Molecular Chaperones as Targets to Circumvent the CFTR Defect in Cystic Fibrosis. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:137.
153. Boinot C, Jollivet Souchet M, Ferru-Clement R, Becq F. Searching for combinations of small-molecule correctors to restore f508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and processing. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2014;350(3):624-34.
154. Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, Bagdany M, Soya N, Xu H, et al. Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function. *Nature chemical biology*. 2013;9(7):444-54.
155. Robert R, Carlile GW, Pavel C, Liu N, Anjos SM, Liao J, et al. Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Molecular pharmacology*. 2008;73(2):478-89.
156. Carlile GW, Robert R, Goepp J, Matthes E, Liao J, Kus B, et al. Ibuprofen rescues mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2015;14(1):16-25.
157. Trzeinska-Daneluti AM, Nguyen L, Jiang C, Fladd C, Uehling D, Prakesch M, et al. Use of kinase inhibitors to correct DeltaF508-CFTR function. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2012;11(9):745-57.
158. Kim Chiaw P, Wellhauser L, Huan LJ, Ramjeesingh M, Bear CE. A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR. *Molecular pharmacology*. 2010;78(3):411-8.
159. Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 2012;67(1):12-8.
160. He L, Kota P, Aleksandrov AA, Cui L, Jensen T, Dokholyan NV, et al. Correctors of DeltaF508 CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(2):536-45.
161. Kopeikin Z, Yuksek Z, Yang HY, Bompadre SG. Combined effects of VX-770 and VX-809 on several functional abnormalities of F508del-CFTR channels. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2014;13(5):508-14.

162. Ren HY, Grove DE, De La Rosa O, Houck SA, Sopha P, Van Goor F, et al. VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Molecular biology of the cell*. 2013;24(19):3016-24.
163. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Corrector VX-809 stabilizes the first transmembrane domain of CFTR. *Biochemical pharmacology*. 2013;86(5):612-9.
164. Phuan PW, Veit G, Tan J, Roldan A, Finkbeiner WE, Lukacs GL, et al. Synergy-based small-molecule screen using a human lung epithelial cell line yields DeltaF508-CFTR correctors that augment VX-809 maximal efficacy. *Molecular pharmacology*. 2014;86(1):42-51.
165. Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *The Biochemical journal*. 2007;406(2):257-63.
166. Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, McColley SA, Rowe SM, Rietschel E, et al. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory medicine*. 2014;2(7):527-38.
167. Blanchard E, Zlock L, Lao A, Mika D, Namkung W, Xie M, et al. Anchored PDE4 regulates chloride conductance in wild-type and DeltaF508-CFTR human airway epithelia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(2):791-801.
168. Baker EH, Clark N, Brennan AL, Fisher DA, Gyi KM, Hodson ME, et al. Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis. *Journal of applied physiology*. 2007;102(5):1969-75.
169. de Prost N, Saumon G. Glucose transport in the lung and its role in liquid movement. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2007;159(3):331-7.
170. Ayoud Meo S. Significance of spirometry in diabetic patients. *International Journal of Diabetes Mellitus*. 2009:47-50.
171. Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, Joseph P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cellular microbiology*. 2006;8(7):1121-33.
172. Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, et al. Involvement of KATP and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(4):L870-82.
173. Beaudoin T, Lafayette S, Nguyen D, Rousseau S. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* caused by mucA mutations result in activation of TLR2 in addition to TLR5 in airway epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;428(1):150-4.
174. Shaykhiev R, Behr J, Bals R. Microbial patterns signaling via Toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival. *PloS one*. 2008;3(1):e1393.
175. Koff JL, Shao MX, Kim S, Ueki IF, Nadel JA. *Pseudomonas* lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *Journal of immunology*. 2006;177(12):8693-700.

176. Bellin MD, Laguna T, Leschyshyn J, Regelman W, Dunitz J, Billings J, et al. Insulin secretion improves in cystic fibrosis following ivacaftor correction of CFTR: a small pilot study. *Pediatric diabetes*. 2013;14(6):417-21.
177. Jurkuvenaite A, Chen L, Bartoszewski R, Goldstein R, Bebok Z, Matalon S, et al. Functional stability of rescued delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(3):363-72.
178. Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, Damante G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2001;281(5):E924-30.
179. Zabner J, Karp P, Seiler M, Phillips SL, Mitchell CJ, Saavedra M, et al. Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;284(5):L844-54.
180. Pedemonte N, Tomati V, Sondo E, Galietta LJ. Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;298(4):C866-74.
181. Cantin AM, Hanrahan JW, Bilodeau G, Ellis L, Dupuis A, Liao J, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function is suppressed in cigarette smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(10):1139-44.
182. Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, Aleksandrov AA, Henderson AG, Zeman KL, et al. Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(2):533-45.
183. Ostedgaard LS, Meyerholz DK, Chen JH, Pezzulo AA, Karp PH, Rokhlina T, et al. The DeltaF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Science translational medicine*. 2011;3(74):74ra24.
184. Jacobsen JN, Andersen AS, Krogfelt KA. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on cellular wound healing responses in vitro. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2012;44(8):615-9.
185. Illek B, Fu Z, Schwarzer C, Banzon T, Jalickee S, Miller SS, et al. Flagellin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(4):L531-42.
186. Wu Q, Lu Z, Verghese MW, Randell SH. Airway epithelial cell tolerance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiratory research*. 2005;6:26.
187. Zahm JM, Delavoie F, Toumi F, Nawrocki-Raby B, Kileztky C, Michel J, et al. Long acting beta2-agonist and corticosteroid restore airway glandular cell function altered by bacterial supernatant. *Respiratory research*. 2010;11:6.
188. Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR, Jr., Das J, Dokholyan NV, et al. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DeltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Science translational medicine*. 2014;6(246):246ra96.
189. Veit G, Avramescu RG, Perdomo D, Phuan PW, Bagdany M, Apaja PM, et al. Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression. *Science translational medicine*. 2014;6(246):246ra97.



## Original Article

# Deleterious impact of hyperglycemia on cystic fibrosis airway ion transport and epithelial repair

Claudia Bilodeau <sup>a,b</sup>, Olivier Bardou <sup>a,b</sup>, Émilie Maillé <sup>a</sup>,  
Yves Berthiaume <sup>b,c</sup>, Emmanuelle Brochiero <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 rue Saint-Denis, Montréal, Québec H2X0A9, Canada

<sup>b</sup> Département de médecine, Université de Montréal, CP6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec H3C3J7, Canada

<sup>c</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), 110 avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec H2W1R7, Canada

Received 17 July 2014; revised 7 April 2015; accepted 10 April 2015

## Abstract

**Background:** Cystic fibrosis (CF)-related diabetes (CFRD) is associated with faster pulmonary function decline. Thus, we evaluated the impact of hyperglycemia on airway epithelial repair and transepithelial ion transport, which are critical in maintaining lung integrity and function.

**Methods:** Non-CF and CF airway epithelial cells were exposed to low (LG) or high (HG) glucose before ion current and wound repair rate measurements.

**Results:** CFTR and K<sup>+</sup> currents decreased after HG treatments. HG also reduced the wound healing rates of non-CF and CF cell monolayers. Although CFTR correction with VRT-325 accelerated the healing rates of CF cells monolayers under LG conditions, this improvement was significantly abrogated under HG conditions.

**Conclusions:** Our data highlights a deleterious impact of hyperglycemia on ion transport and epithelial repair functions, which could contribute to the deterioration in lung function in CFRD patients. HG may also interfere with the beneficial effects of CFTR rescue on airway epithelial repair.

© 2015 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Airways; Epithelial repair; K<sup>+</sup> channels; CFTR; Cystic fibrosis; Diabetes

## 1. Introduction

Improvements in the medical management of patients with cystic fibrosis (CF) have led to a gradual increase in median life expectancy. However, this is associated with emerging co-morbidities, including cystic fibrosis related diabetes (CFRD). The prevalence of this complication increases with age, reaching up to 40% in CF adult patients (for review see [1,2]). The

progression from normal glucose tolerance to glucose intolerance, and then to diabetes, is accompanied with a marked increase in morbidity and mortality in CF patients and a faster decline in pulmonary function [1–6]. In fact, many lines of evidence indicate that diabetes and hyperglycemia, even in non-CF patients, are associated with reduced pulmonary function compared to control non-diabetic subjects (see review [7]).

The mechanisms underlying the effect of diabetes and hyperglycemia on lung function in diabetic patients have not been clearly defined. However, high blood glucose concentrations, in particular in CF patients, have been associated with elevated levels of glucose in the airway and an increased risk of bacterial infections [8–11]. Accordingly, CFRD has been identified as one of the risk factors for both pulmonary exacerbations and their treatment failure [12–14], suggesting a potential decrease in the pulmonary defense against pathogens. Higher

\* Corresponding author. CRCHUM, Tour Viger, 900 rue Saint-Denis, Montréal, Québec H2X0A9, Canada. Tel.: [REDACTED]

E-mail addresses: [REDACTED] (C. Bilodeau),

[REDACTED] (O. Bardou), [REDACTED]

(É. Maillé), [REDACTED] (Y. Berthiaume),

[REDACTED] (E. Brochiero).

levels of oxidative stress and inflammatory mediators may also be responsible for lung tissue injury and remodeling in diabetic patients [15–17]. In fact, it seems that structural changes, including bronchiectasis, airway wall thickening and lung parenchymal histological alterations, have been observed in children with CFRD or impaired glucose tolerance, prior to an associated decline in lung function [18].

Ion transport and epithelial repair, which are crucial for lung function and integrity, may also be impacted by diabetes. An equilibrium between  $\text{Cl}^-$  secretion and  $\text{Na}^+$  absorption is indeed necessary to maintain an adequate periciliary liquid volume and functional mucociliary clearance [19,20]. In addition,  $\text{K}^+$  channels, particularly  $\text{KvLQT1}$ ,  $\text{KCa3.1}$  and  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , also play a role in the control of ion and liquid transport through the airway epithelia [21]. To the best of our knowledge, the impact of hyperglycemia on airway ion transport has not been previously investigated. However, there is evidence that changes in  $\text{K}^+$  currents and the expression of different types of  $\text{K}^+$  channels is modified after modulation of glucose concentrations in  $\beta$ -pancreatic or kidney embryonic cells [22–25]. Interestingly,  $\text{K}^+$  channels are also involved in the regulation of repair processes of several epithelial tissues [26]. Our group has shown that  $\text{KvLQT1}$ ,  $\text{K}_{\text{ATP}}$  and  $\text{KCa3.1}$  channels play a role in airway and alveolar cell migration and proliferation as well as wound repair [27–29]. Some evidence also points to the involvement of  $\text{Cl}^-$  channels [30–32]. Our data showed that CFTR function is crucial for airway epithelial repair and that the basic CFTR defect in CF may be responsible, at least in part, for reduced repair rates in CF airway epithelia [32]. We also showed that a rescue of the CFTR defect with the CFTR corrector VRT-325 led to improved repair rates of CF airway monolayers [32]. However, the impact of hyperglycemia on the repair capacity of non-CF, CF and corrected-CF airway epithelia has not yet been defined.

In light of the evidence that diabetes and hyperglycemia impair the wound-repair capacity of other epithelial tissues [33–35] and affect ion currents and/or channel expression in different cell types [22–25,36], we hypothesized that these crucial functions of the respiratory epithelia may be affected by high glucose levels. To address this, we investigated the effect of exposure of non-CF and CF airway cells to normal glucose (5 mM, low glucose, LG) or 25 mM glucose concentrations (high glucose condition, HG), which has been commonly used to mimic diabetic-like challenge in many studies [23–25,33,35]. We then compared the  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  currents as well as the repair rates of non-CF and CF airway cell monolayers under both conditions. Our data indicated that high glucose treatment impairs ion transport as well as the ability of airway epithelial monolayers to repair after mechanical injury. This deleterious effect on two crucial functions of the airway epithelia could contribute to the decline in pulmonary function in diabetic patients.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

CFBE41o- airway epithelial cells [37], transduced with wt-CFTR (CFBE-wt) or  $\Delta\text{F508}$ -CFTR (CFBE- $\Delta\text{F508}$ ) [38],

were maintained for 8 days in EMEM (Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 10% FBS (Life Technologies), 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and 100 U/ml of penicillin-streptomycin (Life Technologies) in Petri dishes or for 2 to 4 weeks on permeant filters (Costar Transwell, Corning Inc., Corning, NY) coated with 1 mg/ml BSA (Invitrogen), 0.05 mg/ml bovine collagen I (Invitrogen) and 1 mg/ml human fibronectin (VWR, Mont-Royal, Canada), in LHC medium (Life Technologies Inc., Burlington, ON), as previously described [32]. EMEM (containing 5 mM glucose) was supplemented with 20 mM glucose (for a total of 25 mM glucose, high glucose, HG) or 20 mM mannitol (control condition with identical osmotic change, low glucose, LG) 24 h, 48 h or 7 days before experiments.

Primary human airway nasal cells were recovered after polypectomy procedures from CF patients with various genotypes (four homozygous  $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$ , two  $\Delta\text{F508}/\text{N1303}$ , one  $\Delta\text{F508}/\text{undefined}$  and one  $\Delta\text{F508}/\text{A455E}$ , median age 21.5 yrs, mean FEV1 of  $83.1 \pm 6.1\%$ ), according to protocols approved by the CHUM ethical committee and with written informed consent by the patients. After dissection, polyps were digested overnight, at 4 °C, under gentle agitation in MEM (Invitrogen) supplemented with 7.5%  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Fisher, Ottawa, Canada), 0.05 mg/ml gentamycin (Sandoz, Boucherville, QC), 25 U/ml penicillin–streptomycin, 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fungizone (Invitrogen), 0.1% pronase E (Sigma-Aldrich) and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase (Sigma-Aldrich). After pronase-DNase neutralization, the cells were gently scraped off the remaining tissue. Cells were cultured in petri dishes coated with Purecol (Cedarlane, Burlington, Canada) and maintained in complete SAGM (LHC basal medium supplemented with the SAGM kit (Clonetics, Walkersville, MD)) and 25 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich), 100 U/ml of penicillin-streptomycin, 0.07  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phosphorylethanolamine (Sigma-Aldrich), 1.86 ng/ml ethanolamine (Sigma-Aldrich), 0.05 nM retinoic acid (Sigma-Aldrich), stock 11, stock 4 and trace elements [32].

### 2.2. Wound-healing assays

Airway epithelial cells cultured on plastic support were injured mechanically with a pipette tip following a highly reproducible technique [29,32,39]. Marks under the wells allowed us to photograph the wounds exactly at the same place at time 0 after injury and after 6-h of wound-closure (Fig. 3A). The wound repair rates ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) were then measured individually in each wound with ImageJ software, by measuring the wound area at time 0 ( $\mu\text{m}^2$ ) minus the wound area at time 6 h ( $\mu\text{m}^2$ ), this value corresponding to the repaired area ( $\mu\text{m}^2$ ), which is then divided by the duration (6 h). The same procedure was repeated 12 times (i.e. 6 wounds/well, 2 wells/condition, per experiment (n)) and the mean wound repair rates (among the 12 measurements) were calculated. This method allowed us to correct for variations in the initial wound area. It should be emphasized that our method is highly reproducible and the initial wound area were very similar in size. This commonly employed “wound-healing assay” enables the study of the early mechanisms triggered after injury, i.e. cell



migration and proliferation [32]. However, we verified that the basal number of proliferative cells in CFBE-wt and CFBE-ΔF508 cell monolayers during wound repair was similar.

### 2.3. Transepithelial ion currents

Transepithelial ion currents were studied by short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements in an Ussing chamber [28,29,39,40]. Briefly, CFBE cells were cultured on filters at the air-liquid interface until they formed a polarized epithelium with high resistance. After exposure to EMEM containing LG (5 mM glucose + 20 mM mannitol) or HG (25 mM glucose) for a 24-h or 48-h period, filters were washed, mounted in a heated (37 °C) Ussing chamber, and bathed with a symmetrical physiological solution (containing in mM: 141 NaCl, 5.4 KCl, 0.78 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 0.8 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 15 Hepes, pH 7.4) to measure transepithelial currents through intact monolayers. To evaluate the level of K<sup>+</sup> currents through the basolateral membrane,  $I_{sc}$  was measured after establishment of a K<sup>+</sup> gradient and permeabilization of the apical membrane with 7.5 μM amphotericin B. The apical-to-basolateral K<sup>+</sup> gradient was created by bathing the apical side with high K<sup>+</sup> physiological solution, whereas for the basolateral side, KCl was replaced by an equivalent amount of N-methyl-D-glucamine chloride (NMDG-Cl). To evaluate Cl<sup>−</sup> currents through the apical membrane in CFBE-ΔF508 cells, a Cl<sup>−</sup> gradient was established by bathing the cell monolayers with an asymmetrical physiological solution (low Cl<sup>−</sup> concentration solution at the apical side and high Cl<sup>−</sup> concentration at the basolateral side) and the basolateral membrane was permeabilized with 7.5 μM amphotericin B. Transepithelial potential difference was clamped to zero by an external voltage clamp amplifier (VCCMC2, Physiological Instruments, San Diego, CA) with KCl agar-calomel half-cells and Ag–AgCl electrodes, and the resulting  $I_{sc}$  was recorded continuously on a computer with a PowerLab system (ADInstruments, Toronto, ON). Membrane resistance (TER) was verified with 1-mV pulses every 10 s.

### 2.4. Statistics

Groups were compared by non-parametric Mann–Whitney tests with GraphPad (La Jolla, CA) for comparison between CFBE-wt and CFBE-ΔF508. Wilcoxon matched paired tests were used for comparison between mannitol vs glucose conditions in the same cell line. For consistency, all data are presented as bar charts with means ± SEM (the number of repeated experiments (n) is indicated in the figure legends). A probability of  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## 3. Results

First, we assessed the impact of high glucose levels on ion transport, which is crucial for airway epithelial function. Airway CFBE cells cultured on permeant filters were mounted in an Ussing chamber after 24 h treatment with high (25 mM, HG) or low (5 mM, LG) glucose. Transepithelial short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements through intact (non-permeabilized) CFBE-wt monolayers were performed (see representative trace shown in

Fig. 1A). We first noted that neither the basal  $I_{sc}$  current nor the transepithelial resistance was significantly decreased by HG exposure (Fig. 1B). However, cAMP-activated  $I_{sc}$  (following application of forskolin and IBMX,  $\Delta I_{Fk + IBMX}$ ) were significantly lower under HG than under LG conditions (Fig. 1C). A slight decrease in CFTR<sup>Inh172</sup>-sensitive currents ( $\Delta I_{CFTRinh172}$ ) was also measured in the presence of high glucose (Fig. 1D). The effect of HG on CFTR Cl<sup>−</sup> currents was not evaluated in CFBE-ΔF508 monolayers, which do not express functional CFTR channels.

We then assessed UTP-activated currents ( $\Delta I_{UTP}$ ), probably mediated by calcium-activated Cl<sup>−</sup> channels (CaCC), in both CFBE-ΔF508 and CFBE-wt monolayers (see representative trace in Fig. 1E). Although UTP-activated currents through CFBE-wt monolayers were higher than through CFBE-ΔF508 monolayers (Fig. 1F), we noted that these currents were not affected by HG treatments (Fig. 1F).

Several lines of evidence indicate that K<sup>+</sup> channel function is critical to maintain Cl<sup>−</sup> transport through the airway epithelia [41,42]. We thus decided to compare airway K<sup>+</sup> channel function under normal and hyperglycemic conditions. To specifically measure K<sup>+</sup> currents through the basolateral membrane, the apical membrane was permeabilized with amphotericin B and an apical-to-basolateral K<sup>+</sup> gradient was established (see a representative trace at Fig. 2A). Total basolateral K<sup>+</sup> currents (measured after permeabilization with Ampho B,  $\Delta I_{AmphoB}$ ) were reversed by clofilium (inhibiting Kv channels such as KvLQT1) and glibenclamide (inhibitor of K<sub>ATP</sub> channels) (Fig. 2B). As we previously reported in other non-CF (NuLi) and CF (CuFi) airway cell models [29], total K<sup>+</sup> currents ( $\Delta I_{AmphoB}$ ) and  $\Delta I_{clofi + glib}$  through non-CF (CFBE-wt) monolayers were higher than in CF CFBE-ΔF508 monolayers (Fig. 2B, CFBE-wt vs. CFBE-ΔF508). We also observed that HG treatments reduced total K<sup>+</sup> currents (by 21%), as well as  $\Delta I_{clofi + glib}$ , in CFBE-wt cells, to reach current levels similar to those measured in CFBE-ΔF508 (Fig. 2B). We observed that 24-h HG exposure in the CFBE-ΔF508 did not further reduce total K<sup>+</sup> currents (Fig. 2B). However, after a prolonged treatment (48 h), these currents had significantly decreased (by 29%) under HG conditions (Fig. 2C).

We previously demonstrated that ion transport through CFTR [32] and K<sup>+</sup> channels [28,29] plays a crucial role in airway epithelial repair. Moreover, hyperglycemia has been associated with delayed epithelial wound closure [33,35]. In order to evaluate the impact of hyperglycemia on non-CF and CF airway epithelial repair, we employed a well-established wound-healing assay after mechanical injury. First, we confirmed that the wound-healing rates in CFBE-ΔF508 were lower compared to CFBE-wt monolayers (Fig. 3, CFBE-wt vs. CFBE-ΔF508), as previously shown [29,32]. Notably, the presence of 20 mM mannitol (used to mimic the change in osmotic pressure for low glucose conditions) did not affect the repair capacity compared to a low glucose medium without mannitol, even for a 7 day-period (Fig. 3B). We then observed that a 24 h exposure to HG induced a significant decrease in wound repair rates in CFBE-wt monolayers compared to the LG control. A slight, but significant decrease in wound-healing rates was also observed in the CFBE-ΔF508 cell monolayers under HG conditions (Fig. 3C). Extended exposure to HG (48 h, Fig. 3D or 7 days, Fig. 3E) had a significant negative

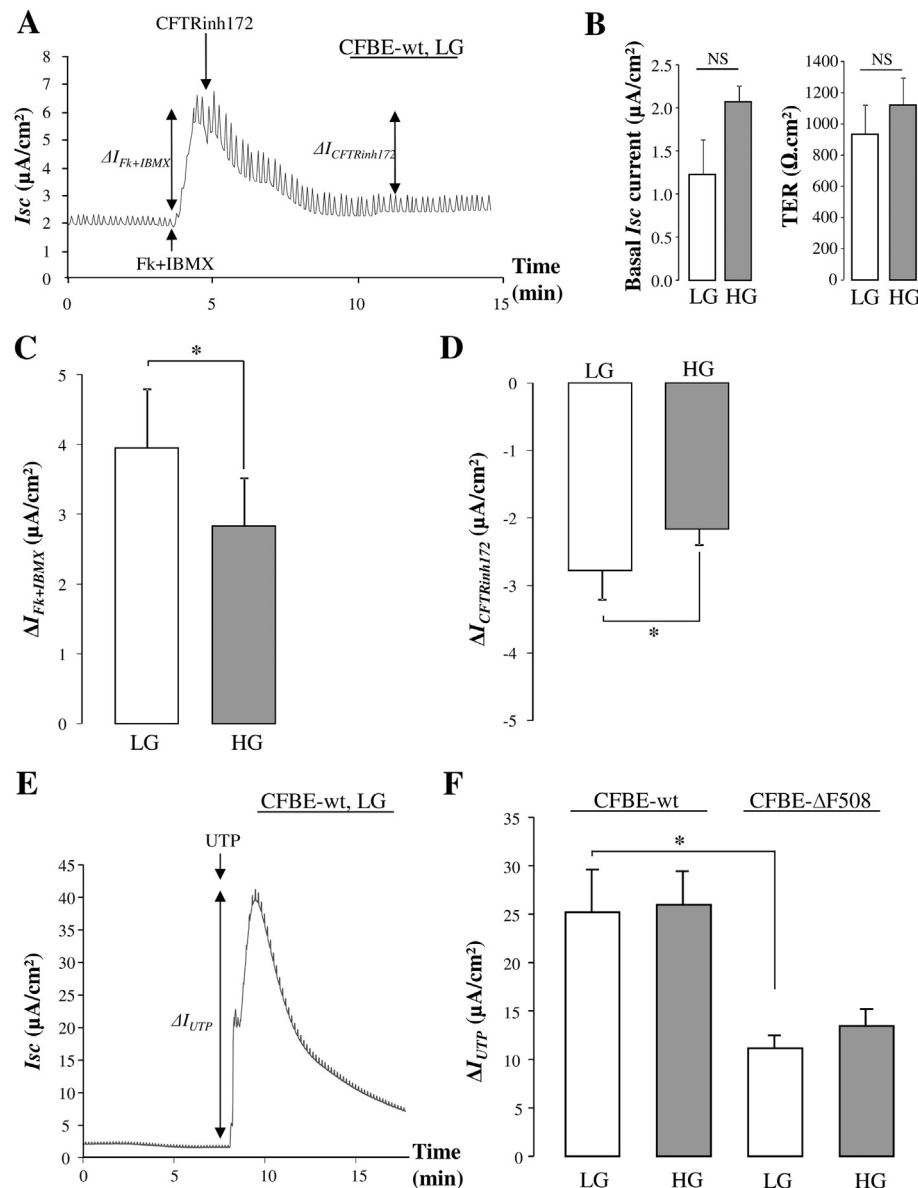


Fig. 1. Impact of high glucose exposure on  $\text{Cl}^-$  currents through non-CF and CF CFBE airway cell monolayers. CFBE-wt and CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for a 24-h period on the basolateral side with low (5 mM glucose + 20 mM mannitol, LG) or high (5 + 20 mM glucose, HG) glucose, prior to short-circuit current ( $I_{\text{sc}}$ ) measurements in an Ussing chamber. Apical and basolateral sides were then bathed with a normal physiological solution. Basal total  $I_{\text{sc}}$  current and transepithelial resistance (TER) were then measured in LG and HG conditions (B,  $n = 8$ ), before application of 10  $\mu\text{M}$  amiloride (to inhibit ENaC currents) and then, forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) and IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) to stimulate cAMP-activated CFTR channels, followed by the CFTR $_{\text{inh172}}$  (20  $\mu\text{M}$ , apical, see a representative trace in A). Quantification of the mean  $\Delta I_{\text{Fk} + \text{IBMX}}$  and  $\Delta I_{\text{CFTRinh172}}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) after LG and HG exposure are reported in panels C and D ( $n = 8$ ). E and F. UTP (100  $\mu\text{M}$ , apical) was applied to stimulate calcium-activated  $\text{Cl}^-$  currents (see a representative trace in E), while mean  $\Delta I_{\text{UTP}}$  currents are reported in F ( $n = 7$ ). \*:  $P < 0.01$ .

effect on the wound-healing capacity of CFBE-wt and CFBE- $\Delta\text{F508}$  cell monolayers ( $P < 0.02$ ).

Our data previously showed that CFTR rescue with the CFTR corrector VRT-325 in CFBE- $\Delta\text{F508}$  and primary human CF airway cell monolayers significantly improved the wound-healing rates [32]. Notably, this improvement seems specific to CFTR and did not induced enhancement in  $\text{K}^+$  current ( $12.7 \pm 1.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vs  $10.1 \pm 1.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , in control and VRT-325 conditions). We then investigated if this strategy with CFTR rescue would be still effective under hyperglycemic conditions. We first observed

that benefits on CFBE- $\Delta\text{F508}$  repair rates following VRT-325 treatment under LG conditions were not maintained after HG exposure (Fig. 4A). Control Ussing experiments indicated that this loss of wound repair capacity is probably not a consequence of impaired CFTR rescue in the presence of HG (Fig. 4B). In primary human CF airway epithelial cell monolayers, we showed a significant improvement of wound-healing rates after correction with VRT-325 under HG conditions; however, these rates remain significantly lower than in the presence of VRT-325 under LG conditions (Fig. 4C).

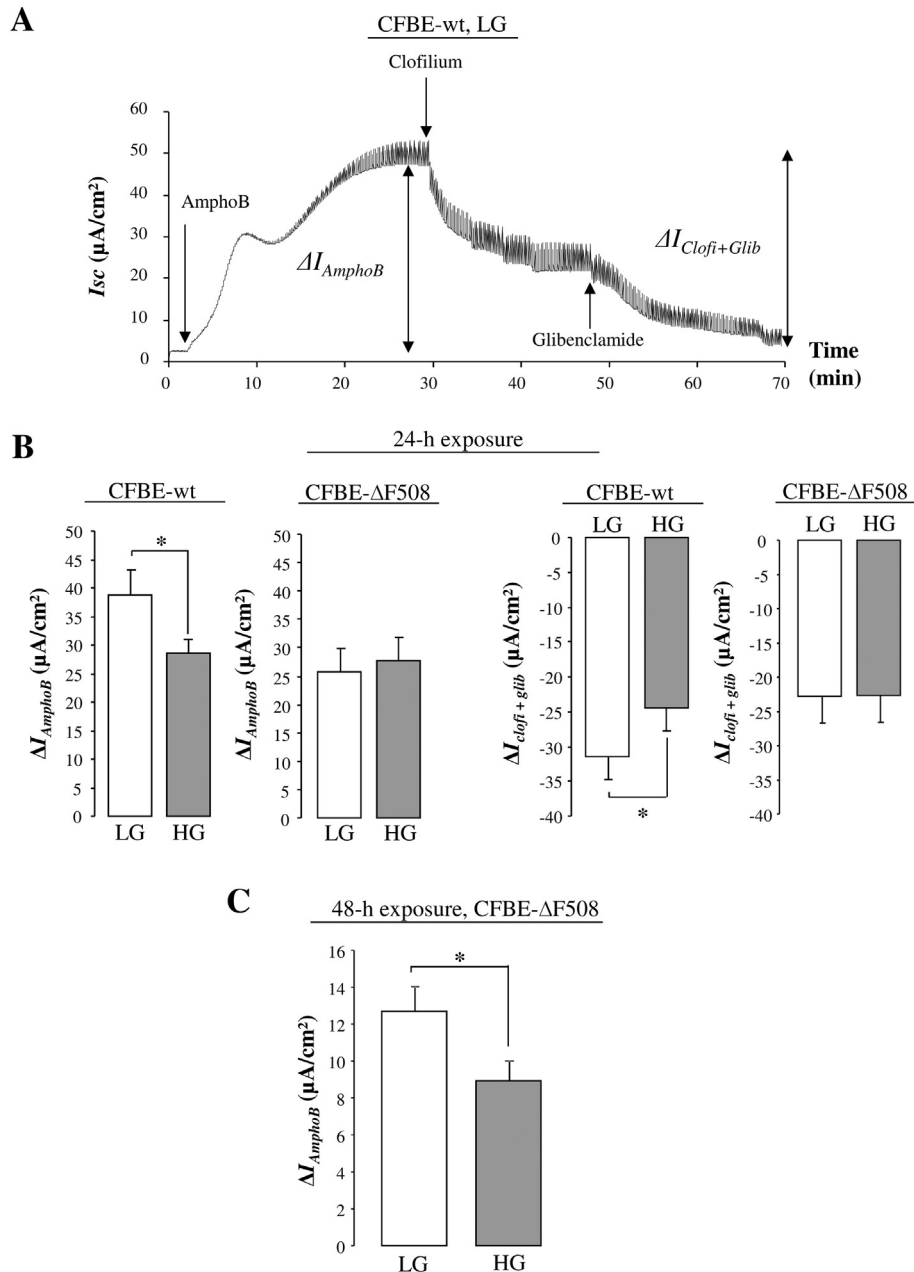


Fig. 2. Reduction of basolateral  $K^+$  currents through CFBE airway cell monolayers by hyperglycemia. CFBE-wt and CFBE- $\Delta F508$  cell monolayers were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for a 24-h (B) or 48-h (C) period on the basolateral side with low or high glucose, prior to short-circuit current measurements in an Ussing chamber. In these experiments, filters were bathed with asymmetrical physiological media (high  $K^+$  at the apical side and low  $K^+$  at the basolateral side, see Materials and methods). The apical membrane was then permeabilized with 7.5  $\mu M$  amphotericin B (Ampho B). Upon stabilization of the current, clofilium (100  $\mu M$ ) and then glibenclamide (100  $\mu M$ ) were applied at the basolateral side (see representative  $I_{sc}$  trace in A). Total basolateral  $K^+$  currents after apical membrane permeabilization with amphotericin B ( $\Delta I_{AmphoB}$ , B, C) as well as clofilium- and glibenclamide-sensitive  $K^+$  currents ( $\Delta I_{clofi + glib}$ , B) were then compared under LG and HG conditions, through CFBE-wt ( $n = 14$ ) and CFBE- $\Delta F508$  ( $n = 6-7$ ). \*:  $P < 0.04$ .

#### 4. Discussion

Our data demonstrates that high glucose exposure reduces transepithelial  $Cl^-$  currents mediated by CFTR as well as basolateral  $K^+$  currents through airway CFBE-wt cells. We also showed that the wound-healing rates of CFBE-wt and CFBE- $\Delta F508$  cell monolayers were altered under HG conditions. More importantly, our results indicate that hyperglycemia affects the

repair rates of CFBE- $\Delta F508$  and primary human CF airway cell monolayers corrected with VRT-325.

Our Ussing chamber experiments showed that cAMP-activated and CFTR<sup>Inh172</sup>-sensitive short-circuit transepithelial currents through CFBE-wt cells were reduced after a 24 h exposure to HG, indicating that CFTR mediated  $Cl^-$  secretion may be affected by hyperglycemia. In contrast, the UTP-stimulated peaks were similar under LG and HG conditions. However, we observed

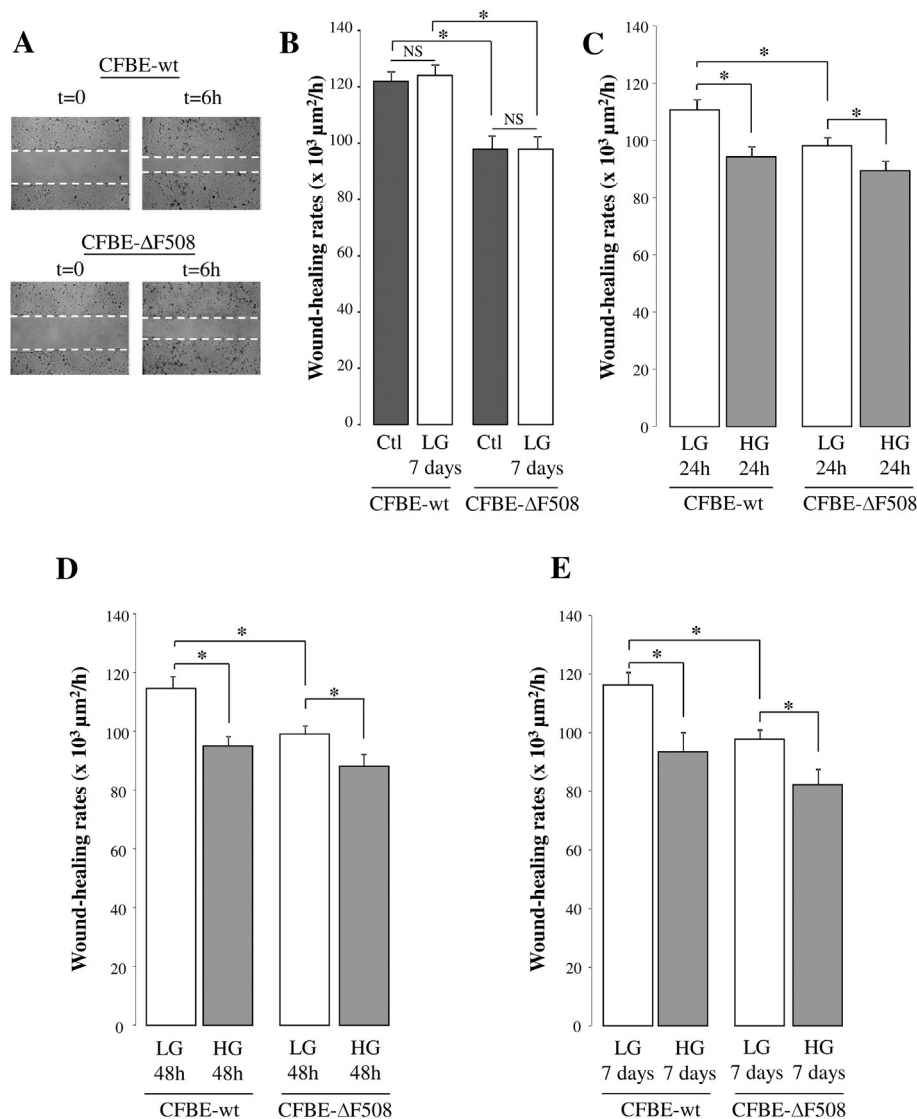


Fig. 3. Decreased wound-healing rates by hyperglycemia in non-CF and CF CFBE airway cell monolayers. CFBE-wt and CFBE-ΔF508 cell monolayers were exposed to a normal culture medium (5 mM glucose, Ctl, B), a culture medium supplemented with mannitol (20 mM mannitol + 5 mM glucose, LG, B, C, D, E) or glucose (25 mM glucose, HG, B, C, D, E) for 24 h (C, n = 12), 48 h (D, n = 17) or 7 days (B, n = 8; E, n = 12) before wounding. The wound-closure rates (μm<sup>2</sup>/h) were monitored over a 6-h period (see representative photographs presented in A) and then compared in control and LG conditions (B) and in LG and HG conditions (C, D, E). \*:  $P < 0.02$ .

that the UTP-stimulated current mediated by calcium-activated Cl<sup>-</sup> (CaCC) channels was smaller in the CFBE-ΔF508 than in the CFBE-wt cells. This observation is in agreement with previous reports showing reduced activity of the CaCC anoctamin 1 (ANO1) channel [30] and ATP-stimulated currents [43] in CF cells. Similarly, we measured smaller K<sup>+</sup> currents in the CFBE-ΔF508 cells than in the CFBE-wt, as we previously reported in other non-CF and CF cell models (NuLi-1 and CuFi-1 cells, respectively) [29]. We found that the K<sup>+</sup> currents through the CFBE-ΔF508 cells were not further decreased by a 24 h hyperglycemic treatment. A longer exposure (48 h) was required to significantly affect K<sup>+</sup> currents in CFBE-ΔF508 cells. Our data also demonstrates that total basolateral K<sup>+</sup> currents through CFBE-wt cells were lower after a 24 h exposure to HG (compared to LG). Because clofilium- and glibenclamide-sensitive currents were also reduced, we postulated that Kv (probably KvLQT1) and

K<sub>ATP</sub> channels may be affected by HG exposure. In line with these observations, it was previously reported that K<sub>ATP</sub> currents and Kir6.2 surface expression in β-pancreatic cells were higher under LG conditions than after pretreatment with 11 mM glucose [22]. Down-regulation of BKCa channels expressed in HEK293 cells has also been observed after exposure to high (22–25 mM) glucose levels [23,24]. Conversely, Kv2.1 expression and Kv currents were enhanced after prolonged treatment with 28 mM glucose of pancreatic β-cells [25]. In dogs, diabetes induction leads to reduced cardiac transient outward (I<sub>to</sub>) and slow delayed rectifier (IKs) K<sup>+</sup> currents as well as decreased Kv4.3 and MinK (KCNE1) expression, whereas Kv1.4 and KvLQT1 expression is increased [36]. Thus, it appears that hyperglycemia may elicit channel subtype and tissue dependent effects on K<sup>+</sup> channels and the mechanisms whereby high glucose regulates K<sup>+</sup> currents remain to be defined. These modulations in K<sup>+</sup> channel activity

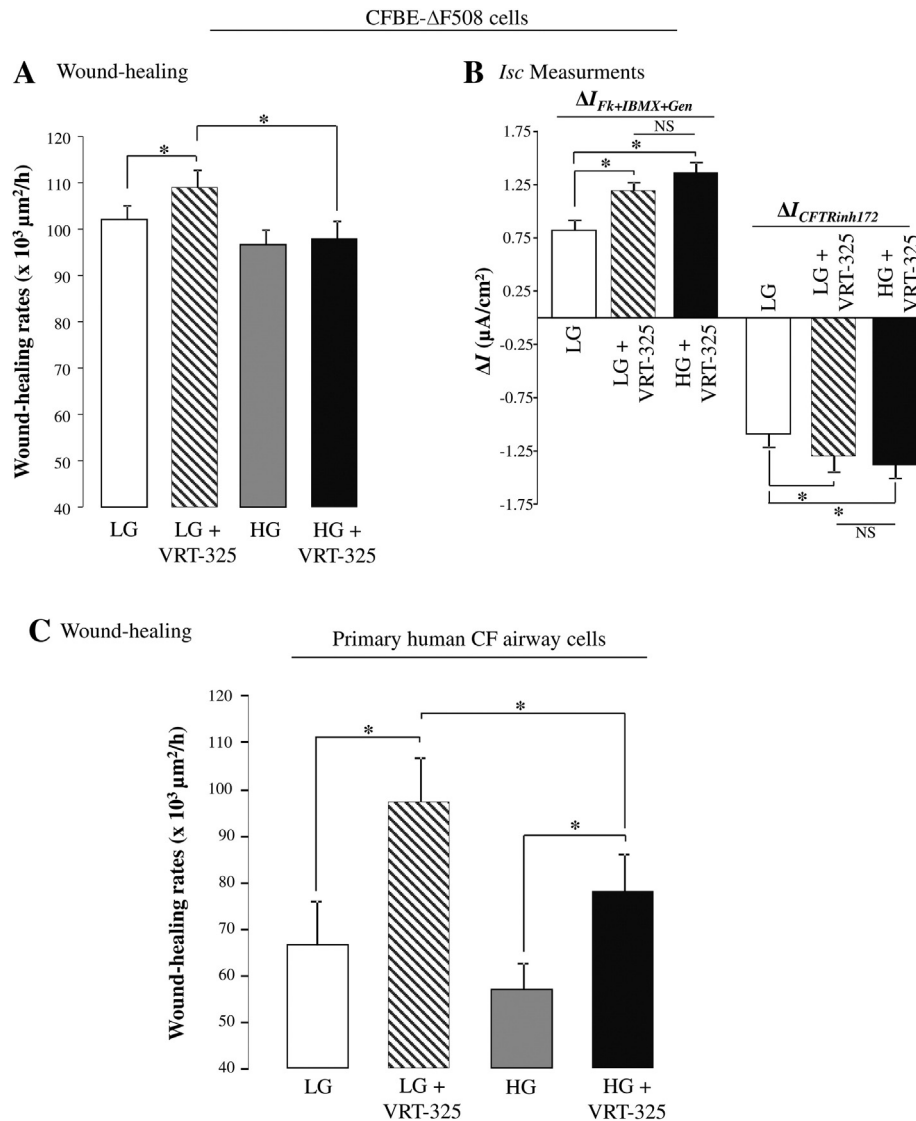


Fig. 4. Decreased wound-healing rates by hyperglycemia in rescued CF airway cell monolayers. CFBE-ΔF508 (A,  $n = 13$ ; B,  $n = 7$ ) and primary human CF airway (C,  $n = 8$ ) epithelial cell monolayers were exposed to culture medium containing low or high glucose, in the absence or presence of the CFTR corrector VRT-325 (5  $\mu$ M) for 24 h before wounding and/or using chamber measurements. The wound-closure rates ( $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ) were then monitored over a 6-h period. \*:  $P < 0.03$ . For *I*<sub>sc</sub> measurements, a  $\text{Cl}^-$  gradient was established by bathing the cell monolayers with an asymmetrical physiological solution (low  $\text{Cl}^-$  concentration solution at the apical side and high  $\text{Cl}^-$  concentration at the basolateral side) and the basolateral membrane was permeabilized with 7.5  $\mu$ M amphotericin B. Cells were then sequentially exposed to a combination of forskolin (10  $\mu$ M, Fk), IBMX (100  $\mu$ M) and genistein (30  $\mu$ M, Gen), followed by CFTR<sub>Inh-172</sub> (20  $\mu$ M). The mean  $\Delta I_{\text{Fk} + \text{IBMX} + \text{Gen}}$  and  $\Delta I_{\text{CFTRInh172}}$  short-circuit currents (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) were measured in LG, LG + VRT-325 and HG + VRT-325 conditions (B).

may have secondary impacts on the transport of other ions. In epithelial tissues, for example,  $\text{K}^+$  channel function is crucial to maintaining membrane potential and electrochemical gradients necessary for  $\text{Cl}^-$  secretion. In airway cells, it has been shown that pharmacological modulation of  $\text{K}^+$  channels strongly impacted  $\text{Cl}^-$  transport [44–46]. It could thus be proposed that the inhibition of basolateral  $\text{K}^+$  currents under HG conditions observed in our study may play a role in decreasing CFTR currents. However, we cannot exclude the involvement of other mechanisms.

As we had previously reported in several cell models [29,32], our wound-healing assays confirmed a delayed wound repair in CFBE-ΔF508 cell monolayers compared to non-CF (CFBE-wt) under normal low glucose conditions. A 24 h, 48 h and 7 days exposure to HG then induced a significant decrease in both

CFBE-wt and CFBE-ΔF508 wound repair. Delayed wound closure in the presence of high glucose levels has also been observed in other models. In porcine corneal epithelial cells cultured in the presence of high glucose [33] and cornea from diabetic rats [34], delayed wound closure has been associated with impaired EGFR/PI3K/AKT signaling pathways, whereas impaired skin healing was accompanied by a reduction in IGF-1 levels in diabetic pigs [47]. In contrast, increased vascular smooth muscle cell proliferation and migration, controlled by  $\beta$ 3-integrin signaling, has been reported under hyperglycemic conditions [48]. Thus, the regulation of repair processes following changes in glucose levels may be mediated by multiple pathways/responses, including changes in growth factor release, growth factor receptor activation, integrin expression and downstream signaling



pathways. However, it has been established that airway repair mechanisms are also controlled by  $K^+$  and CFTR channels [29,31,32]. Thus, it could be postulated that the delay in wound healing of CFBE monolayers observed after HG exposure may be due, at least in part, to reduced CFTR and  $K^+$  currents under hyperglycemic conditions. It has to be noted, however, that in our study wound healing assays were carried out on plastic support whereas Ussing chamber measurements were performed on polarized cultures on permeant filters. This difference in culture conditions may have an impact on repair processes.

Finally, our data confirmed our previous reported [32] that CFTR rescue with the CFTR corrector VRT-325 enhanced the wound-closure rates in CFBE-ΔF508 and primary human CF airway cell monolayers. Here, we demonstrated that HG treatment completely abolished the benefits of the VRT-325 on wound repair in CFBE-ΔF508 cells. However, this effect did not appear to be mediated through a deleterious impact of HG on CFTR rescue, which was not affected as indicated by control Ussing chamber measurements. Our experiments showing reduced  $K^+$  currents through CFBE-ΔF508 cells in the presence of HG suggest that this reduction could be mediating the observed decrease in wound repair. However, other mechanisms cannot be excluded.

We also observed that HG elicited a less deleterious effect in CF primary airway cell monolayers. Nevertheless, the wound-healing rates after treatment with VRT-325 and HG remained lower than in the presence of VRT-325 and LG. To the best of our knowledge, this is the first report on the impact of hyperglycemia on airway epithelial repair of CFTR-rescued CF cells. Moreover, the efficiency of CFTR correctors to improve lung integrity and function has never been compared in CF patients with or without CFRD.

In summary, our results indicate that hyperglycemia impairs both ion transport and epithelial repair function in airway epithelial cells. Down-regulation of these two major functions of airway epithelial cells in diabetic patients may have an impact on lung integrity and function in both non-CF and CF patients. Moreover, hyperglycemia may disrupt the benefits of CFTR correctors on airway repair.

## 5. Conflict of interest

I and all authors declare that we have no personal, professional or financial conflict of interest.

## Acknowledgments

This study was funded by Cystic Fibrosis Canada (research grant #2368 and small team grant to E. Brochiero and Y. Berthiaume, studentship to C. Bilodeau), Université de Montréal (studentship to O. Bardou), Centre de recherche du CHUM (CRCHUM) and the Université de Montréal (scholarship to E. Brochiero). We thank R.J. Bridges (Dept. of Physiology and Biophysics, Rosalind Franklin University, North Chicago, IL, USA) and Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Inc. (CFFT) for providing VRT-325. We thank the Biobank of respiratory tissues of CRCHUM/IRCM of the Respiratory Health Network of

FRQ-S. Finally, we acknowledge the editorial work and logistical assistance from the Research Support Office, CRCHUM.

## References

- [1] Moran A, Becker D, Casella SJ, Gottlieb PA, Kirkman MS, Marshall BC, et al. Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis-related diabetes: a technical review. *Diabetes Care* Dec 2010;33(12):2677–83.
- [2] Noronha RM, Calliari LE, Damaceno N, Muramatu LH, Monte O. Update on diagnosis and monitoring of cystic fibrosis-related diabetes mellitus (CFRD). *Arq Bras Endocrinol Metabol* Nov 2011;55(8):613–21.
- [3] Koch C, Rainisio M, Madessani U, Harms HK, Hodson ME, Mastella G, et al. Presence of cystic fibrosis-related diabetes mellitus is tightly linked to poor lung function in patients with cystic fibrosis: data from the European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* Nov 2001;32(5):343–50.
- [4] Heianza Y, Arase Y, Tsuji H, Saito K, Amakawa K, Hsieh SD, et al. Low lung function and risk of type 2 diabetes in Japanese Men: the Toranomon Hospital Health Management Center study 9 (TOPICS 9). *Mayo Clin Proc* Sep 2012;87(9):853–61.
- [5] Ziegler B, Oliveira CL, Rovedder PM, Schuh SJ, Abreu E, Silva FA, et al. Glucose intolerance in patients with cystic fibrosis: sex-based differences in clinical score, pulmonary function, radiograph score, and 6-minute walk test. *Respir Care* Mar 2011;56(3):290–7.
- [6] Kerem E, Viviani L, Zolin A, MacNeill S, Hatziaorou E, Ellemunter H, et al. Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *Eur Respir J* Jan 2014;43(1):125–33.
- [7] Meo SA. Significance of spirometry in diabetic patients. *Int J Diab Mellitus* 2009;2:47–50.
- [8] Baker EH, Clark N, Brennan AL, Fisher DA, Gyi KM, Hodson ME, et al. Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis. *J Appl Physiol* May 2007;102(5):1969–75.
- [9] Brennan AL, Gyi KM, Wood DM, Johnson J, Holliman R, Baines DL, et al. Airway glucose concentrations and effect on growth of respiratory pathogens in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* Apr 2007;6(2):101–9.
- [10] Philips BJ, Meguer JX, Redman J, Baker EH. Factors determining the appearance of glucose in upper and lower respiratory tract secretions. *Intensive Care Med* Dec 2003;29(12):2204–10.
- [11] Philips BJ, Redman J, Brennan J, Wood D, Holliman R, Baines D, et al. Glucose in bronchial aspirates increases the risk of respiratory MRSA in intubated patients. *Thorax* Sep 2005;60(9):761–4.
- [12] Jarad NA, Giles K. Risk factors for increased need for intravenous antibiotics for pulmonary exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. *Chron Respir Dis* 2008;5(1):29–33.
- [13] Parkins MD, Rendall JC, Elborn JS. Incidence and risk factors for pulmonary exacerbation treatment failures in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* Feb 2012;141(2):485–93.
- [14] Sequeiros IM, Jarad N. Factors associated with a shorter time until the next pulmonary exacerbation in adult patients with cystic fibrosis. *Chron Respir Dis* Feb 2012;9(1):9–16.
- [15] Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, Berthiaume Y, Poutout V, Prentki M, et al. Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev* Nov 2009;30(4):153–77.
- [16] Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondon M, Charry L, et al. Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med* 2010;10:38.
- [17] Brennan AL, Geddes DM, Gyi KM, Baker EH. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* Dec 2004;3(4):209–22.
- [18] Widger J, Ranganathan S, Robinson PJ. Progression of structural lung disease on CT scans in children with cystic fibrosis related diabetes. *J Cyst Fibros* May 2013;12(3):216–21.
- [19] Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* Jan 2003;445(4):495–8.

- [20] Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:174306.
- [21] Bardou O, Trinh NT, Brochiero E. Molecular diversity and function of K<sup>+</sup> channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Feb 2009;296(2):L145–55.
- [22] Lim A, Park SH, Sohn JW, Jeon JH, Park JH, Song DK, et al. Glucose deprivation regulates KATP channel trafficking via AMP-activated protein kinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* Dec 2009;58(12):2813–9.
- [23] Chang H, Ma YG, Wang YY, Song Z, Li Q, Yang N, et al. High glucose alters apoptosis and proliferation in HEK293 cells by inhibition of cloned BK Ca channel. *J Cell Physiol* Jun 2011;226(6):1660–75.
- [24] Lu T, He T, Katusic ZS, Lee HC. Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance Ca<sup>2+</sup> + -activated K<sup>+</sup> channels by high glucose. *Circ Res* Sep 15 2006;99(6):607–16.
- [25] Chu KY, Cheng Q, Chen C, Au LS, Seto SW, Tuo Y, et al. Angiotensin II exerts glucose-dependent effects on Kv currents in mouse pancreatic beta-cells via angiotensin II type 2 receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* Feb 2010;298(2):C313–23.
- [26] Girault A, Brochiero E. Evidence of K<sup>+</sup> channel function in epithelial cell migration, proliferation and repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;306: C307–19.
- [27] Girault A, Prive A, Trinh NT, Bardou O, Ferraro P, Joubert P, et al. Identification of KvLQT1 K<sup>+</sup> channels as new regulators of non-small cell lung cancer cell proliferation and migration. *Int J Oncol* Mar 2014; 44(3):838–48.
- [28] Trinh NT, Prive A, Kheir L, Bourret JC, Hijazi T, Amraei MG, et al. Involvement of KATP and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Jul 13 2007;293:L870–82.
- [29] Trinh NT, Prive A, Maille E, Noel J, Brochiero E. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Nov 2008;295(5):L866–80.
- [30] Ruffin M, Voland M, Marie S, Bonora M, Blanchard E, Blouquit-Laye S, et al. Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* Sep 2013;27.
- [31] Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol* Nov 2010;299(5):C912–21.
- [32] Trinh NT, Bardou O, Prive A, Maille E, Adam D, Lingée S, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* Dec 2012;40:1390–400.
- [33] Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, Yu FS. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes* May 2009; 58(5):1077–85.
- [34] Xu K, Yu FS. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* May 2011;52(6):3301–8.
- [35] Lan CC, Wu CS, Kuo HY, Huang SM, Chen GS. Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes. *Br J Dermatol* Jun 2009;160(6):1206–14.
- [36] Lengyel C, Virag L, Biro T, Jost N, Magyar J, Biliczki P, et al. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res* Feb 1 2007;73(3):512–20.
- [37] Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol* May 1993;8(5):522–9.
- [38] Bebek Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, et al. Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o-airway epithelial monolayers. *J Physiol* Dec 1 2005;569(Pt 2):601–15.
- [39] Maille E, Trinh NT, Prive A, Bilodeau C, Bissonnette E, Grandvaux N, et al. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Dec 2011;301(6):L945–55.
- [40] Klein H, Garneau L, Trinh NT, Prive A, Dionne F, Goupil E, et al. Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* Feb 2009; 296(2):C285–95.
- [41] MacVinish LJ, Hickman ME, Mufti DA, Durrington HJ, Cuthbert AW. Importance of basolateral K<sup>+</sup> conductance in maintaining Cl<sup>-</sup> secretion in murine nasal and colonic epithelia. *J Physiol* Jul 1 1998;510(Pt 1):237–47.
- [42] Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, et al. Modulation of Ca<sup>2+</sup> + -activated Cl<sup>-</sup> secretion by basolateral K<sup>+</sup> channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res* Apr 2003;53(4):608–18.
- [43] Blouquit S, Regnier A, Dannhoffer L, Fermanian C, Naline E, Boucher R, et al. Ion and fluid transport properties of small airways in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* Aug 1 2006;174(3):299–305.
- [44] Devor DC, Bridges RJ, Pilewski JM. Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* Aug 2000;279(2):C461–79.
- [45] Mall M, Wissner A, Schreiber R, Kuehr J, Seydewitz HH, Brandis M, et al. Role of K(V)LQT1 in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* Sep 2000;23(3):283–9.
- [46] Cowley EA, Linsdell P. Characterization of basolateral K<sup>+</sup> channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol* Feb 1 2002;538(Pt 3):747–57.
- [47] Velander P, Theopold C, Hirsch T, Bleiziffer O, Zuhaili B, Fossum M, et al. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen* Mar 2008;16(2):288–93.
- [48] Panchatcharam M, Miriyala S, Yang F, Leitges M, Chrzanowska-Wodnicka M, Quilliam LA, et al. Enhanced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in response to vascular injury under hyperglycemic conditions is controlled by beta3 integrin signaling. *Int J Biochem Cell Biol* Jun 2010;42(6):965–74.



# Deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and rescue in airway epithelial cells

Nguyen Thu Ngan Trinh<sup>1,2,5</sup>, Claudia Bilodeau<sup>1,2,5</sup>, Émilie Maillé<sup>1</sup>,  
Manon Ruffin<sup>1,2</sup>, Marie-Claude Quintal<sup>3</sup>, Martin-Yvon Desrosiers<sup>1</sup>,  
Simon Rousseau<sup>4</sup> and Emmanuelle Brochiero<sup>1,2</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada. <sup>2</sup>Dept de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada. <sup>3</sup>Paediatric Otolaryngology Service, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada. <sup>4</sup>Meakins-Christie Laboratories, Dept of Medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada. <sup>5</sup>Both authors contributed equally.

**Correspondence:** Emmanuelle Brochiero, CRCHUM, Tour Viger, 900 rue St-Denis, Montréal, QC, H2X09A, Canada. E-mail: [REDACTED]

**ABSTRACT** The epithelial response to bacterial airway infection, a common feature of lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis, has been extensively studied. However, its impact on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel function is not clearly defined. Our aims were, therefore, to evaluate the effect of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR function and expression in non-cystic fibrosis airway epithelial cells, and to investigate its impact on  $\Delta F508$ -CFTR rescue by the VRT-325 corrector in cystic fibrosis cells.

CFTR expression/maturation was evaluated by immunoblotting and its function by short-circuit current measurements.

A 24-h exposure to *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM) reduced CFTR currents as well as total and membrane protein expression of the wildtype (wt) CFTR protein in CFBE-wt cells. In CFBE- $\Delta F508$  cells, PsaDM severely reduced CFTR maturation and current rescue induced by VRT-325. We also confirmed a deleterious impact of PsaDM on wt-CFTR currents in non-cystic fibrosis primary airway cells as well as on the rescue of  $\Delta F508$ -CFTR function induced by VRT-325 in primary cystic fibrosis cells.

These findings show that CFTR function could be impaired in non-cystic fibrosis patients infected by *P. aeruginosa*. Our data also suggest that CFTR corrector efficiency may be affected by infectious components, which should be taken into account in screening assays of correctors.



@ERSpublications

Exposure of airway epithelial cell to *P. aeruginosa* impairs CFTR function, expression and rescue by correctors <http://ow.ly/IleTw>

This article has supplementary material available from [erj.ersjournals.com](http://erj.ersjournals.com)

Received: April 23 2014 | Accepted after revision: Dec 28 2014

**Support statement:** This study was funded by Cystic Fibrosis Canada (research grant E. Brochiero, studentship C. Bilodeau), CRCHUM and Université de Montréal (E. Brochiero and C. Bilodeau), the Canadian Thoracic Society, the Fondation GO and the CORAMH (Studentship N.T.N. Trinh). Funding information for this article has been deposited with FundRef

**Conflict of interest:** None declared.

Copyright ©ERS 2015



## Introduction

Chloride and bicarbonate secretion through cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channels is crucial in airways to maintain an adequate periciliary liquid volume and an efficient mucociliary clearance [1], as well as to control airway surface liquid pH [2], which are necessary to protect the lung against infections. Despite these mechanisms of defence, lungs are frequently exposed to infection/inflammation, which are common features of several lung pathologies including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cystic fibrosis (CF). The impact of infection on airway epithelia has been extensively studied and it has been established that the continuous presence of pathogens is associated with oxidative stress and chronic inflammatory responses [3–5]. However, the consequences of exposure to infections on CFTR channel expression and function have not been clearly defined. In fact, contradictory results have been reported depending on the bacterial strain, the duration of exposure to infection, as well as the cellular models tested [6–9]. However, it is crucial to understand the outcomes of microbial infection on CFTR. Indeed, a decrease of CFTR function in airways of infected patients would further reduce defence against infections, thus creating a vicious circle of infections impairing CFTR, and then dysfunctional CFTR favouring infections.

In CF, due to mutations in the *Cftr* gene, dysfunctional CFTR is associated with reduced periciliary volume and mucus accumulation, favouring bacterial colonisation and chronic inflammation [5, 10]. The prevalence of respiratory pathogens in CF patients varies as a function of age, but the most frequently found bacteria in adults are *Pseudomonas aeruginosa*, which gradually colonise CF airways [11]. Therefore, many of the current therapies in CF are directed against infection as well as towards attenuating the inflammatory response [12, 13]. In addition, many efforts have recently been put towards the development of new strategies directly targeting the basic CFTR defects rather than CF symptoms [14, 15]. New therapies, adapted to each specific class of mutations, are thus progressively emerging. Among them, small molecules called correctors are directed against class II mutations, including the most frequent mutation in CF patients, a deletion of F508 ( $\Delta$ F508-CFTR) leading to improper folding, endoplasmic reticulum trapping and protein degradation [14, 15]. Efficient CFTR maturation and delivery to the cell membrane has been reported after treatment with various corrector molecules, including corr-2b, corr-4a, VRT-325, MPB-07, KM1160, C18 and VX-809 [16–25]. However, to the best of our knowledge most high throughput screening assays to identify efficient corrector molecules are performed in the absence of infectious products. Notably, it has been previously reported that *P. aeruginosa* exposure reduced CFTR rescue induced by low temperature [6]. Because microbial infection is a key component of CF lung disease, it would thus be crucial to assess the efficiency of small molecules targeting CFTR defects in the presence of infection.

The aim of this study was first to evaluate the impact of *P. aeruginosa* diffusible material (PsaDM) on CFTR function and expression in non-CF airway epithelial cells. We then assessed the effect of PsaDM on CFTR protein degradation and synthesis as well as membrane expression. Finally, we tested if *P. aeruginosa* exoproducts could affect  $\Delta$ F508-CFTR maturation and functional rescue by the CFTR corrector VRT-325 in CF airway epithelial cells.

## Materials and methods

### Cell culture

CFBE- $\Delta$ F508 and CFBE-wt cell lines (CFBE41o– parental cells [26] stably transduced, respectively, with  $\Delta$ F508-CFTR and with wildtype (wt)-CFTR [27]) were used initially. Primary human airway cells were isolated from tissues obtained from non-CF and CF patients (with class II mutations, including  $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 and  $\Delta$ F508/N1303K, median age 23 years, mean forced expiratory volume in 1s of  $82 \pm 9\%$ ) undergoing nasal polypectomy at CHUM (Montreal, QC, Canada) and CHU Sainte-Justine (Montreal, QC, Canada) hospitals [28], according to approved ethical protocols. Written informed consents have been obtained from all participants. Cell isolation and culture conditions are detailed in the online supplementary material.

### Preparation of *P. aeruginosa* diffusible material

In brief, *P. aeruginosa* mucoid strain PACF508 was isolated from the sputum of a CF patient ( $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508, CHU Sainte-Justine) and was grown in lysogeny broth (LB) medium (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) for 72 h (corresponding to the late stationary phase) [29] at 37°C with shaking at 250 rpm. The bacterial culture was then centrifuged and the supernatant was filtered successively through 0.8, 0.45 and 0.2  $\mu$ m filters. LB was used as the control condition.

### Immunoblotting

Total proteins were extracted from CFBE cells treated or not with VRT-325 (Cystic Fibrosis Foundation Therapeutic Inc. (CFFT) Bethesda, MA, USA), LB, PsaDM, cycloheximide (CHX) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and/or with MG132 (Abmole Bioscience, Kowloon, Honk Hong). For CFTR [28]

and epidermal growth factor receptor (EGFR) [30] detection, the upper section of the membrane was incubated with the polyclonal anti-CFTR 596 antibody (CFFT) or anti-EGFR antibody (anti-erbB1; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); whereas the bottom section was incubated with purified mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody (Cedarlane Laboratory, Burlington, ON, Canada) to ensure equivalent loading. The expression of CFTR was reported as percentage relative to cells with LB, after normalisation to  $\beta$ -actin signal.

#### ***Biotinylation and pull-down***

CFBE-wt cells, treated with LB or PsADM, were exposed to sulfo-NHS-SS-biotin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) before protein solubilisation in RIPA. The proteins were then absorbed on streptavidin beads, transferred onto a Pierce spin column (Thermo Fisher Scientific Inc.), and then eluted with a 2X sample buffer, before separation on SDS-Page and CFTR detection by immunoblotting.

#### ***Immunofluorescence assay***

CFTR proteins were detected by immunofluorescence assay on CFBE cells, seeded on Lab-Tek chamber slides (Thermo Fisher Scientific Inc.) and treated with LB or PsADM before incubation with anti-CFTR 596 antibody (CFFT) and then Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse antibody (Life Technologies Inc.). Slides were finally counterstained with To-Pro-3 iodide (Life Technologies Inc.) and fluorescent images were captured by a Confocal Leica TCS\_SP5 microscope (see supplementary methods for details).

#### ***Electrophysiology***

Short-circuit currents ( $I_{sc}$ ) [30–32] were measured through CFBE and primary airway cells [28] that had been cultured on coated permeant filters until they reached an air-liquid interface and formed a polarised epithelium with high resistance [33, 34]. Measurements were performed (see supplementary material for details) on intact monolayers or through apical membranes after permeabilisation of the basolateral side with 7.5  $\mu$ M amphotericin B (Sigma-Aldrich), in the presence of a symmetrical physiological solution or a chloride ( $Cl^-$ ) gradient, as indicated in figure legends.

#### ***CFTR mRNA expression***

Total RNA from CFBE cells treated with PsADM or LB was purified with TRIzol reagent (Life Technologies Inc.) [28], and CFTR mRNA expression was evaluated by qPCR as described in the supplementary material. The expression of CFTR was reported as percentage relative to cells treated with LB.

#### ***Statistics***

The data are presented as means $\pm$ SE. Groups were compared by paired t-test or non-parametric Wilcoxon test, with Statview (SAS Institute, Cary, NC, USA) and GraphPad (La Jolla, CA, USA) software, respectively. A probability of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

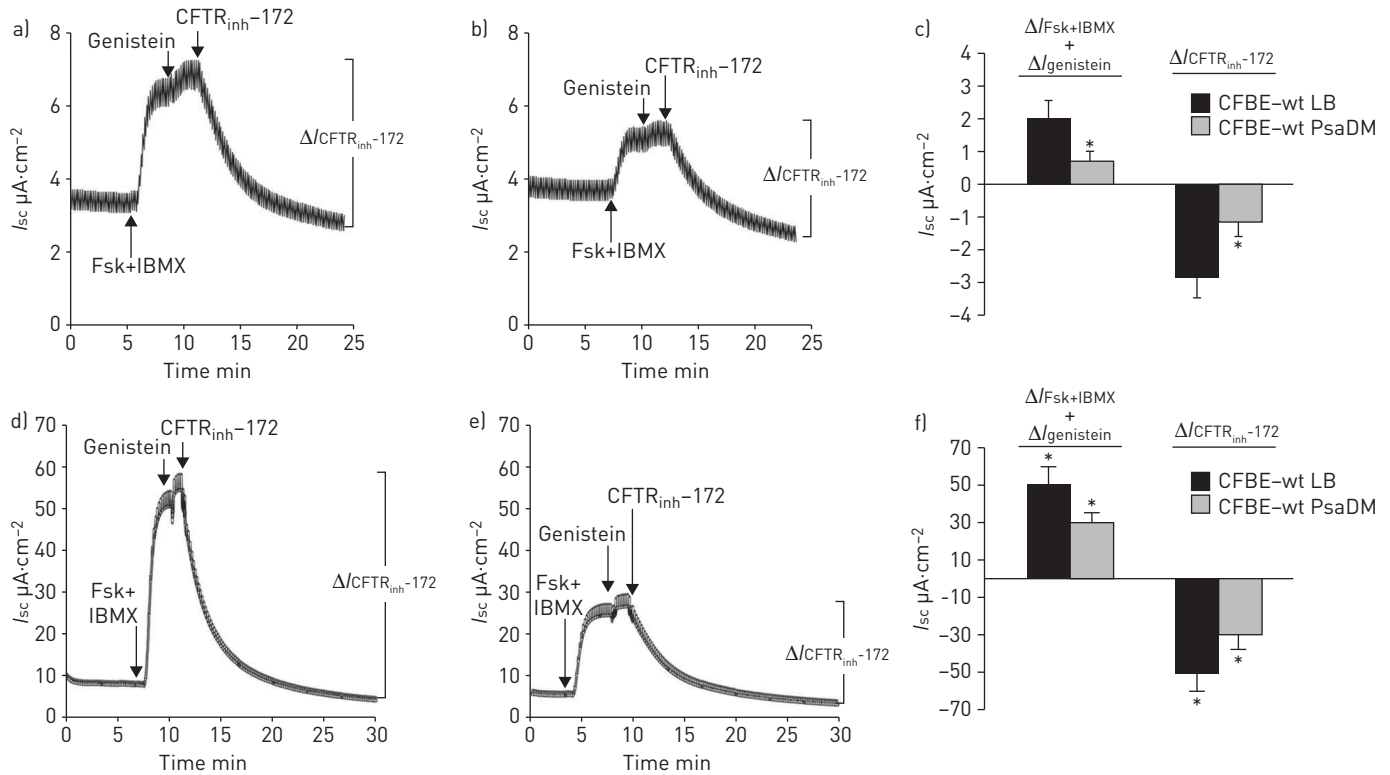
### **Results**

#### ***Decrease in CFTR function induced by P. aeruginosa exoproducts***

We first evaluated the impact of PsADM on CFTR function in polarised airway epithelial CFBE-wt cell monolayers grown on permeant filters. Cells were treated with either LB (control) or PsADM for a 24-h period before  $I_{sc}$  measurements. Just before mounting in an Ussing chamber, intact cell monolayers were washed and bathed with a symmetrical physiological solution supplemented with amiloride in order to inhibit sodium ( $Na^+$ ) currents through epithelial sodium channel (ENaC) channels. Forskolin (Fsk), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and genistein were then applied at the apical membrane to stimulate cAMP-activated  $Cl^-$  secretion through CFTR channels, which was finally inhibited by the CFTR<sub>inh</sub>-172 (fig. 1a). We observed that the change in  $I_{sc}$  current ( $\Delta I_{sc}$ ) after CFTR activation/potentialisation ( $\Delta I_{Fsk+IBMX+\Delta I_{genistein}}$ ) was significantly reduced in monolayers treated with PsADM ( $0.7 \pm 0.3 \mu A \cdot cm^{-2}$ ) when compared to the LB control ( $2.0 \pm 0.5 \mu A \cdot cm^{-2}$ ,  $p < 0.02$ ) (fig. 1c). Similarly, CFTR<sub>inh</sub>-172-sensitive CFTR current ( $\Delta I_{CFTR_{inh}-172}$ ) was also markedly affected by exposure to PsADM ( $-1.2 \pm 0.4 \mu A \cdot cm^{-2}$  compared to  $-2.8 \pm 0.6 \mu A \cdot cm^{-2}$  for LB,  $p < 0.02$ ) (fig. 1c).

To assess the specific effect of 24-h treatment with PsADM on  $Cl^-$  currents through the apical membrane, a series of experiments was performed on CFBE-wt cell monolayers after permeabilisation of the basolateral membrane and establishment of a  $Cl^-$  gradient. Although cAMP-stimulated and CFTR<sub>inh</sub>-172-sensitive  $Cl^-$  currents were higher in these conditions (fig. 1d) than through intact monolayers (fig. 1a), a significant reduction was observed in PsADM treated monolayers (fig. 1f).

We also noted a significant inhibition by PsADM of UTP-stimulated currents, probably mediated by CaCC channels ( $11.1 \pm 1.9$  and  $5.5 \pm 0.8 \mu A \cdot cm^{-2}$ , in LB and PsADM treated CFBE-wt cell monolayers,  $n=6$ ,  $p < 0.04$ ).



**FIGURE 1** Decrease of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function after *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment in CFBE-wt airway cell monolayers. CFBE-wt cells were cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated for 24 h with either 10% of lysogeny broth (LB) medium (a and d) or *P. aeruginosa* filtrate (PsaDM) (b and e) before short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements in an Ussing chamber. a and b) Intact cell monolayers were bathed in a symmetrical physiological medium supplemented with 10  $\mu M$  amiloride and then sequentially exposed to a combination of 10  $\mu M$  forskolin (Fsk) and 100  $\mu M$  3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), followed by 30  $\mu M$  genistein and, finally, 20  $\mu M$  CFTR<sub>inh</sub>-172. d and e) A chloride ( $Cl^{-}$ ) gradient was established by bathing the cell monolayers with an asymmetrical physiological solution (low  $Cl^{-}$  concentration solution at the apical side and high  $Cl^{-}$  concentration at the basolateral side) and the basolateral membrane was permeabilised with 7.5  $\mu M$  amphotericin B. Cells were then sequentially exposed to a combination of Fsk, IBMX and genistein, followed by CFTR<sub>inh</sub>-172. Representative  $I_{sc}$  traces are reported for each condition, i.e. intact condition and  $Cl^{-}$  gradient, for LB a) and d), respectively, and for PsaDM b) and e), respectively. While quantification of the mean  $\Delta I_{sc}$  after Fsk+IBMX+genistein and  $\Delta/CFTR_{inh}-172$   $I_{sc}$  after LB and PsaDM exposure is reported for c) intact condition and f)  $Cl^{-}$  gradient. For intact condition n=5, p<0.02 and for  $Cl^{-}$  gradient n=6, p<0.006. \*: p<0.05.

It has to be noted that exposure to PsaDM did not elicit any decrease in transepithelial resistance ( $1018 \pm 39$  and  $1398 \pm 97 \Omega \cdot cm^2$  in LB and PsaDM conditions, respectively).

#### Decrease in CFTR expression induced by *P. aeruginosa* exoproducts

We then investigated if the observed decrease in CFTR function induced by *P. aeruginosa* exoproducts in CFBE cells was associated with reduced CFTR expression. We first tested the impact of PsaDM on CFTR mRNA expression in non-CF CFBE-wt cells as well as in CF CFBE- $\Delta F508$  cells. As shown in figure 2a, the number of CFTR mRNA copies measured by real-time PCR in CFBE-wt cells remains unchanged in the presence of PsaDM. Meanwhile, PsaDM slightly decreased the level of expression of CFTR mRNA in CFBE- $\Delta F508$  (p<0.006) (fig. 2b).

We then assessed the impact of PsaDM on total CFTR-protein expression by immunoblotting. As expected, immature and mature CFTR bands (band B and C, respectively) were detected in CFBE-wt cells (fig. 2c) while the immature band B was visible in lysates from CFBE- $\Delta F508$  cells expressing the  $\Delta F508$ -CFTR mutant protein (fig. 2d). It was then observed that the intensity of both bands in CFBE-wt was severely reduced in the presence of PsaDM (by 73% and 40%, respectively, p<0.04), when compared to LB control (fig. 2e). In CFBE- $\Delta F508$  cells, the immature form of CFTR was also affected by PsaDM exposure (57% decrease, p<0.0002) (fig. 2f). It has to be noted that equal amounts of proteins were loaded in each condition and signals were normalised to  $\beta$ -actin (which was not altered by PsaDM, see  $\beta$ -actin detection from the same immunoblots, fig. 2c and d).

The effect of PsaDM on CFTR membrane expression in CFBE-wt cells was finally evaluated. Immunoblotting assays, after surface biotinylation, revealed that infectious products significantly reduced the level of CFTR plasma-membrane expression compared to the control (fig. 3a and b). Complementary confocal

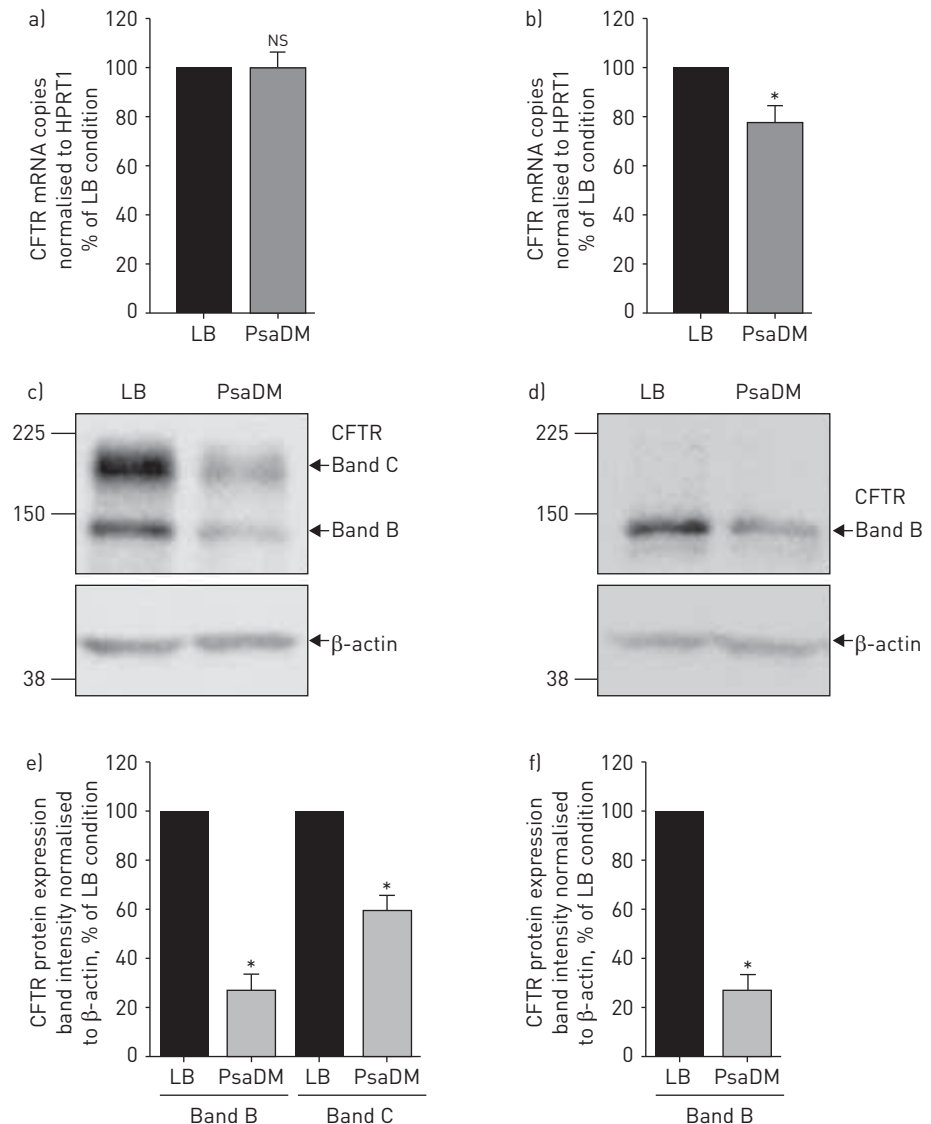
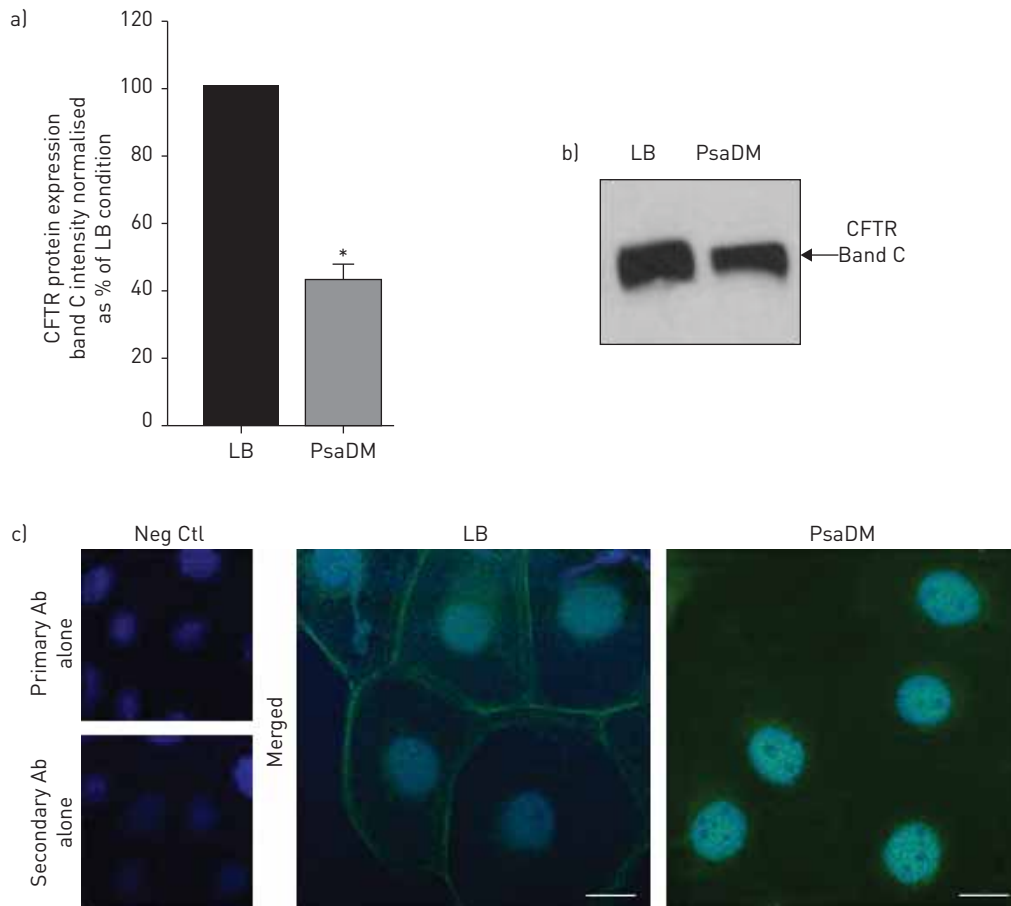


FIGURE 2 Decrease cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression after *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment. a, c and e) CFBE-wt or b, d and f) CFBE-ΔF508 cells were cultured for 8 days (until confluence was reached), then treated with either 10% of lysogeny broth (LB) medium or PsaDM for 24 h. Levels of CFTR mRNA a) CFBE-wt (n=8) and b) CFBE-ΔF508 (n=5) and protein expression for e) CFBE-wt (n=5) and f) CFBE-ΔF508 (n=5) were quantified and reported as percentage of the LB control ( $p < 0.04$ ). Representative immunoblots are presented in c) and d) for CFBE-wt and CFBE-ΔF508, respectively. NS: nonsignificant; \*:  $p < 0.05$ .

immunofluorescence experiments also showed that CFTR membrane localisation observed in CFBE-wt cells in control conditions (*i.e.* with LB) was dramatically affected after exposure to PsaDM (fig. 3c). Taken together, these results demonstrated that bacterial exoproducts affected CFTR expression, localisation and function.

#### Impact of *P. aeruginosa* exoproducts on CFTR protein degradation and synthesis

In order to define if the observed decrease in total CFTR protein level in the presence of PsaDM could be due to enhanced protein degradation, we blocked protein translation by exposing CFBE-wt cells to CHX for 0, 2, 8, 18, 24 and 32 h, in the presence or absence of PsaDM. We then measured the remaining level of CFTR protein by immunoblotting (normalised to β-actin, and expressed as % of time 0 h in control condition). As shown in figure 4a, the decrease in CFTR protein abundance following 8, 18 and 32 h CHX treatments was slightly, but significantly, higher in the presence of PsaDM ( $p < 0.05$ ). However, this potential increase in CFTR degradation after exposure to PsaDM may not be sufficient to explain the large decrease in CFTR protein level shown in figure 2e. A possible impact of PsaDM on CFTR synthesis was thus assessed by exposing CFBE-wt cells to MG132, a proteasomal inhibitor, for 0, 2, 8 and 18 h in the

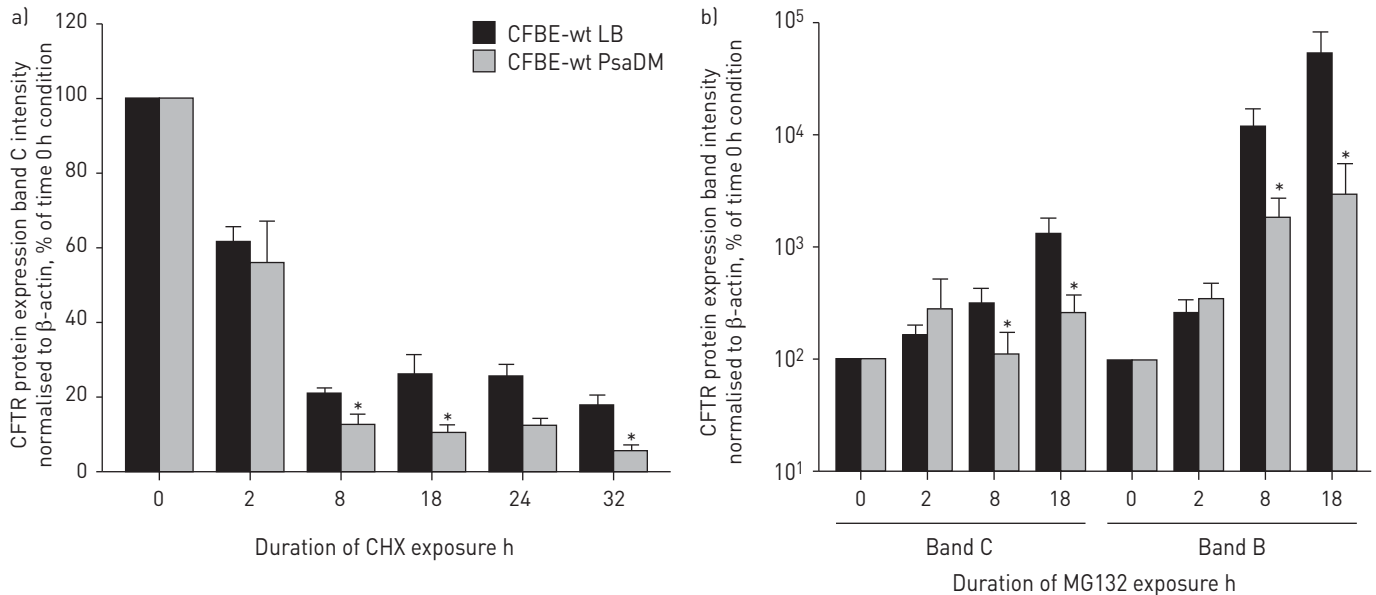


**FIGURE 3** Decrease of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression after *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment in CFBE-wt airway cells. a and b) The level of CFTR expression at the cell surface in CFBE-wt cells treated for 24 h with lysogeny broth (LB) medium or PsaDM was measured by immunoblotting after surface biotinylation and reported as a percentage of LB control (n=6, p<0.04). b) A representative immunoblot. c) Subconfluent CFBE-wt cells were treated with either LB or PsaDM for 24 h, then fixed and stained with the anti-CFTR antibodies (Ab) coupled to Alexa Fluor 488 conjugated anti-mouse antibody (green). Nuclei were stained with To-Pro-3 in all conditions. Primary and secondary Ab were also incubated alone for negative controls. Fluorescent images were captured at  $\times 100$  magnification by a Confocal Leica TCS\_SP5 microscope. Representative images from six different experiments are reported. Neg Ctl: negative control. Scale bar=10  $\mu$ m

presence or absence of PsaDM and then measuring the accumulation of CFTR protein by immunoblotting. We observed (fig. 4b) that the accumulation of wt-CFTR protein bands B and C was higher under control conditions (LB) than in the presence of PsaDM (p<0.04), suggesting that *P. aeruginosa* exoproducts could reduce CFTR protein synthesis. To confirm that the huge accumulation of CFTR protein observed after proteasomal inhibition with MG132 (MG132+LB at 18 h) (fig. 5a and b) was secondary to newly synthesised CFTR proteins, we verified that a co-treatment with CHX (MG132+CHX+LB) totally prevented CFTR accumulation. Again, our data showed that CFTR protein accumulation was severely impacted by PsaDM (MG132+PsaDM) compared to MG132+LB condition (p<0.05). We also measured the levels of EGFR expression to define if PsaDM could also affect a non-channel membrane protein. Although EGFR accumulation after proteasomal inhibition with MG132 was lower than that of CFTR, we noted that PsaDM exposure did not significantly affected EGFR levels (fig. 5c).

#### Impaired CFTR rescue in the presence of *P. aeruginosa* exoproducts

In the light of this evidence pointing towards a deleterious effect of PsaDM on CFTR function and expression, we then decided to investigate if PsaDM had an impact on the ability of the CFTR corrector VRT-325 to rescue  $\Delta$ F508-CFTR maturation and function in CF cells. As previously reported [28], we first confirmed that VRT-325 partially rescued CFTR mature band C protein expression (fig. 6a and b, of note is the comparison between LB and LB+VRT-325) as well as CFTR currents through the apical membrane of CFBE- $\Delta$ F508 cell monolayers (fig. 6c and d, CFBE- $\Delta$ F508 LB versus CFBE- $\Delta$ F508 LB+VRT-325). Indeed,  $I_{sc}$  measurements revealed that CFBE- $\Delta$ F508 cell monolayers treated for 24 h with VRT-325



**FIGURE 4** Impact of *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment on the degradation and synthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein in CFBE-wt airway cell monolayers. CFBE-wt cells were treated with a) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of cycloheximide (CHX) for 2, 8, 18, 24 and 32 h, ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ) or with b) 5  $\mu\text{M}$  of MG132 for 2, 8 and 18 h ( $n=11$ ,  $p<0.04$ ), in the presence of 10% lysogeny broth (LB) medium or PsaDM. The whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE separation and analysed by immunoblotting with anti- $\beta$ -actin (used as loading control) and anti-CFTR antibodies to evaluate the kinetics of CFTR protein degradation in the presence of CHX (a) and the accumulation of newly synthesised CFTR proteins in the presence of the proteasomal inhibitor MG132 (b). \*:  $p<0.05$ .

elicited significantly higher cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  currents, sensitive to the CFTR<sub>inh</sub>-172, compared to the LB control condition (fig. 6c, d and f).

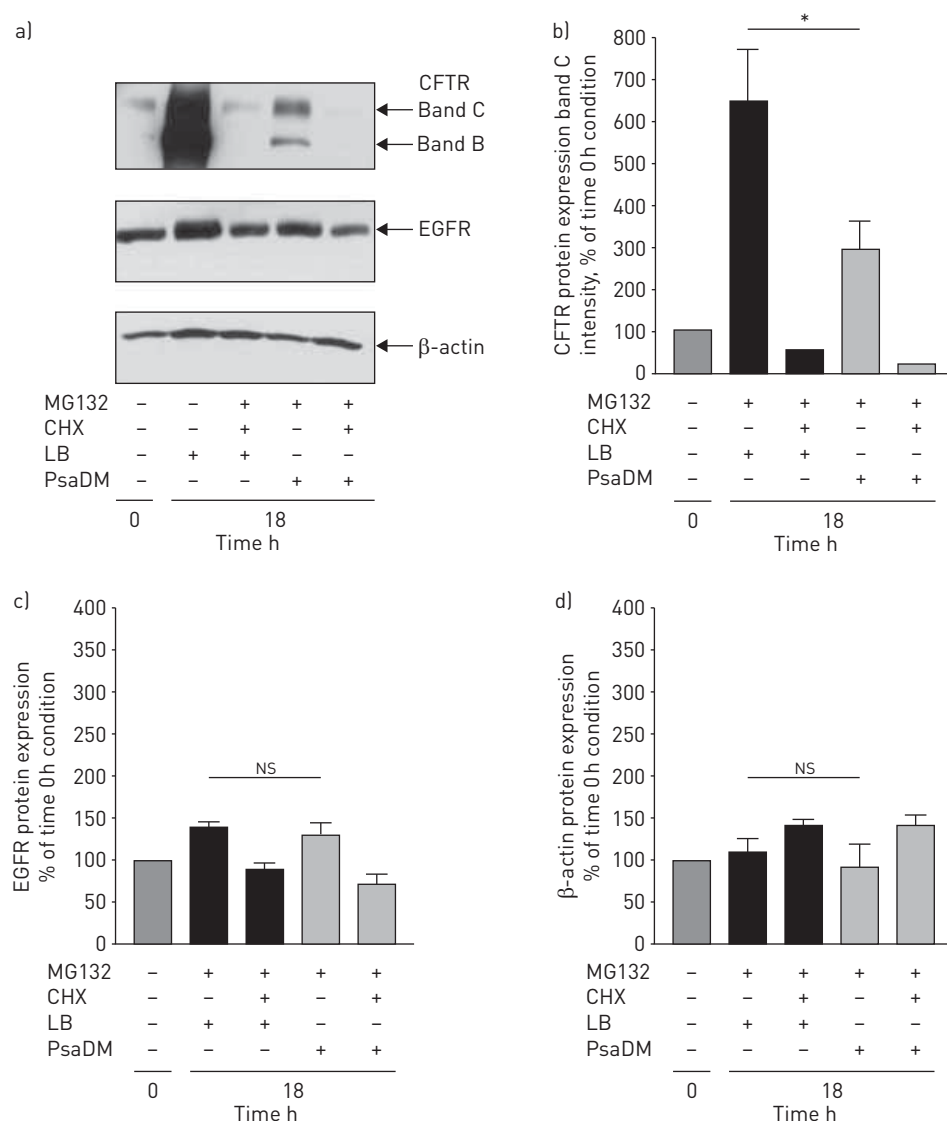
However, in the presence of PsaDM for 24 h (PsaDM+VRT-325) we noted a drastic decrease in band C maturation/expression, compared to the signal in the LB+VRT-325 ( $p<0.02$ ) (fig. 6a and b). The outcome of PsaDM on the rescue of  $\Delta\text{F508}$ -CFTR channel function by VRT-325 was then assessed. As shown in figure 6d–f, cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  secretion following CFTR activation/potentialisation ( $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX+genistein}}$ ) was notably decreased in PsaDM+VRT-325 ( $0.66\pm0.68 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) when compared to LB+VRT-325 ( $2.16\pm0.32 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $p<0.03$ ). Furthermore, VRT-325-rescued CFTR<sub>inh</sub>-172-sensitive CFTR currents in the presence of PsaDM (PsaDM+VRT-325,  $-1.74\pm0.58 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) were also smaller than in LB (LB+VRT-325,  $-2.89\pm0.47 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $p<0.02$ ) (fig. 6d–f). These results indicated that the rescue of  $\Delta\text{F508}$ -CFTR channel function by the CFTR corrector VRT-325 is strongly impaired by *P. aeruginosa* exoproducts.

#### Deleterious impact of *P. aeruginosa* exoproducts on CFTR function in primary human airway epithelial cells

The effect of PsaDM on CFTR function was finally assessed in primary human airway epithelial cells isolated from non-CF and CF patients. In non-CF airway cells, we confirmed a significant reduction in cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  secretion ( $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX}}$  of  $13.9\pm3.5$  versus  $8.9\pm2.7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively under LB and PsaDM conditions,  $p<0.05$ ), as well as CFTR<sub>inh</sub>-172-sensitive ( $\Delta I_{\text{CFTR}_{inh}-172}$ ,  $-18.5\pm3.1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  in LB versus  $-13.5\pm3.1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  in PsaDM) CFTR currents by *P. aeruginosa* exoproducts (fig. 7). Moreover, the rescue of CFTR currents in CF airway primary cells, induced by VRT-325, was also impaired in the presence of PsaDM ( $\Delta I_{\text{Fsk+IBMX}}$  of  $1.1\pm0.4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  versus  $0.4\pm0.4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively in the presence of LB+VRT-325 or PsaDM+VRT-325,  $p<0.03$ ) (fig. 8). CFTR<sub>inh</sub>-172-sensitive CFTR currents were also slightly reduced in the presence of PsaDM.

#### Discussion

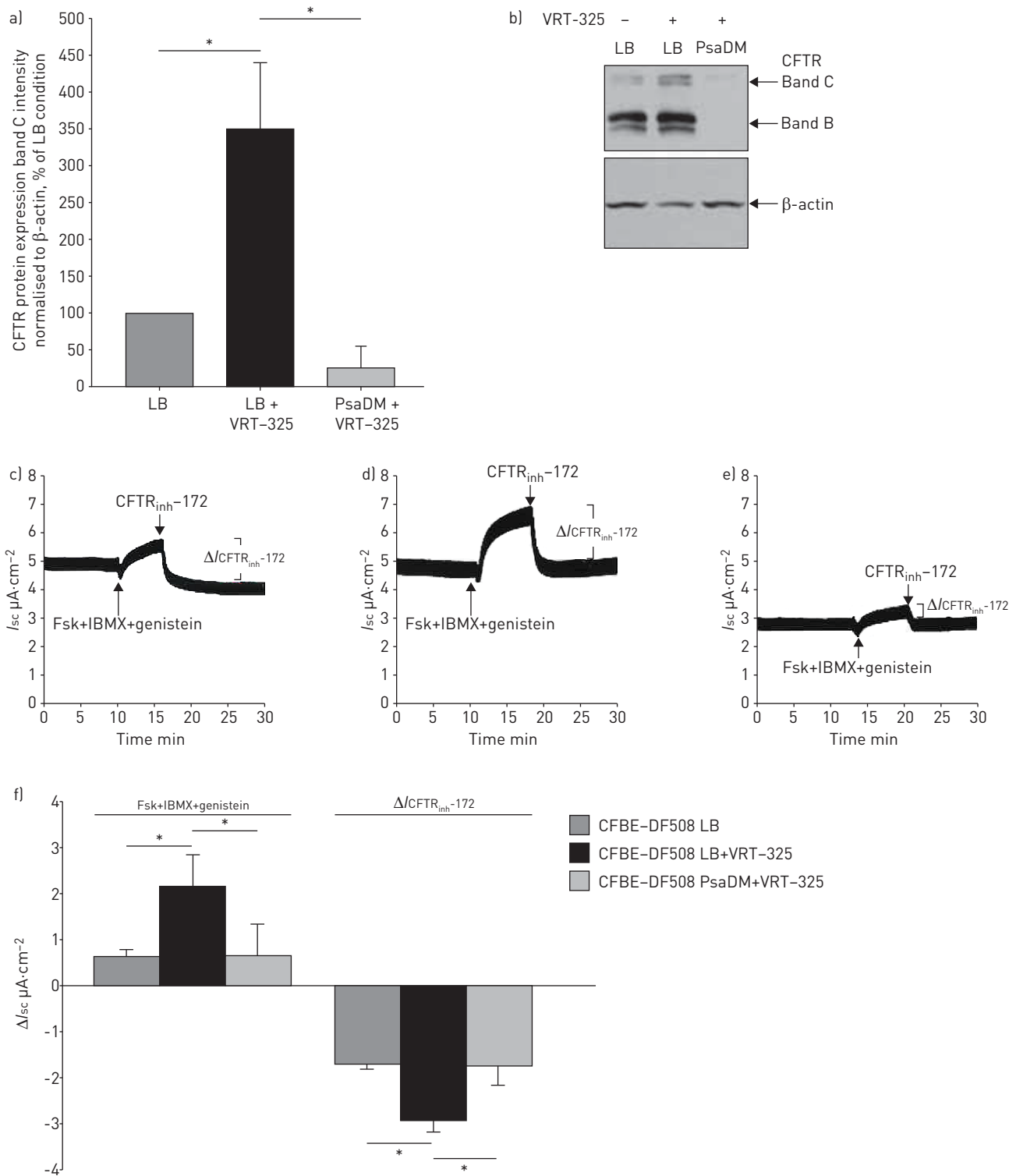
Altogether, our data demonstrated that exoproducts from *P. aeruginosa* impacted CFTR function in both CFBE-wt cells and primary human airway epithelial cells isolated from non-CF patients. A decrease in CFTR protein expression was observed, which could be due, at least in part, to enhanced protein degradation and reduced protein synthesis. *P. aeruginosa* exoproducts also affected CFTR membrane expression. Importantly, our study also revealed that the functional rescue of  $\Delta\text{F508}$ -CFTR by a CFTR corrector in CFBE- $\Delta\text{F508}$  cells and CF primary human airway epithelial cells was impaired in the presence of bacterial products.



**FIGURE 5** Impact of *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) proteins in CFBE-wt airway cell monolayers. CFBE-wt cells were treated with 5  $\mu$ M of MG132 (for 18 h) alone or in combination with cycloheximide (CHX) (MG132 +CHX), in the presence of lysogeny broth (LB) medium or PsaDM. a and b) CFTR, a and c), EGFR, and a and d)  $\beta$ -actin proteins were detected by immunoblotting with their respective antibodies. A representative immunoblot is presented in a) and protein levels were quantified and reported as a percentage of the LB control in b–d). NS: nonsignificant; n=6; p<0.03; \*: p<0.05.

### Impaired CFTR function by infectious products

Our Ussing chamber experiments on CFBE-wt cells presented in figure 1 demonstrated that a 24-h exposure to diffusible materials from a clinical isolate of *P. aeruginosa* (PACF508 strain) induced a significant reduction in cAMP-activated  $\text{Cl}^-$  currents through CFTR channels. We are aware that the observed decrease in cAMP-activated currents after exposure to PsaDM could be due to a secondary effect on other cAMP-dependent channels, such as the basolateral KvLQT1 potassium channel. To further define if the effect of PsaDM is specific of CFTR, another series of experiments were undertaken on CFBE-wt cells, after permeabilisation of the basolateral membrane and establishment of a  $\text{Cl}^-$  gradient, to focus on  $\text{Cl}^-$  currents through the apical membrane. As presented in figure 1d–f, a significant reduction in both cAMP-activated and CFTR<sub>inh-172</sub>-sensitive currents was observed in PsaDM treated CFBE-wt cell monolayers. This result confirmed the impact of *P. aeruginosa* exoproducts on CFTR function. It has to be noted that PsaDM also reduced UTP-activated currents through CaCC channels, thus potentially precluding a possible compensatory effect of the CaCC after inhibition of CFTR channels in infectious conditions.



**FIGURE 6** Impairment of  $\Delta F508$  cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ( $\Delta F508$ -CFTR) functional rescue after *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment. **a)** CFTR band C protein expression in nontreated CFBE- $\Delta F508$  cells (*i.e.* lysogeny broth (LB) medium alone) and in CFBE- $\Delta F508$  cells treated with 5  $\mu M$  VRT-325 for 24 h in the presence of 10% LB (LB+VRT-325) or PsaDM (PsaDM+VRT-325) was quantified and reported as percentage of the LB control ( $n=8$ ,  $p<0.04$ ). **b)** A representative immunoblot. **c-f)** Short-circuit currents ( $I_{sc}$ ) were measured in an Ussing chamber through CFBE- $\Delta F508$  cells, cultured on permeant filters at the air-liquid interface. After mounting in an Ussing chamber, cells were bathed with an asymmetrical physiological solution (low chloride ( $Cl^-$ ) concentration solution at the apical side and high  $Cl^-$  concentration at the basolateral side) and the basolateral side was permeabilised with 7.5  $\mu M$  amphotericin B. Upon  $I_{sc}$  stabilisation, cells were exposed to a mix of forskolin (Fsk), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and genistein, and then with CFTR<sub>inh</sub>-172. Representative  $I_{sc}$  traces are reported for each condition: **c)** nontreated (LB), **d)** treated for 24 h before electrophysiological measurements with VRT-325 or **e)** treated with a combination of VRT-325 and PsaDM. **f)** Quantifications of the mean  $\Delta I_{Fsk+IBMX+genistein}$  and  $\Delta I_{CFTR_{inh}-172}$   $I_{sc}$  in LB, LB+VRT-325 and PsaDM+VRT-325 conditions ( $n=6$ ,  $p<0.03$ ).  $n=6$ ; \*:  $p<0.05$ .



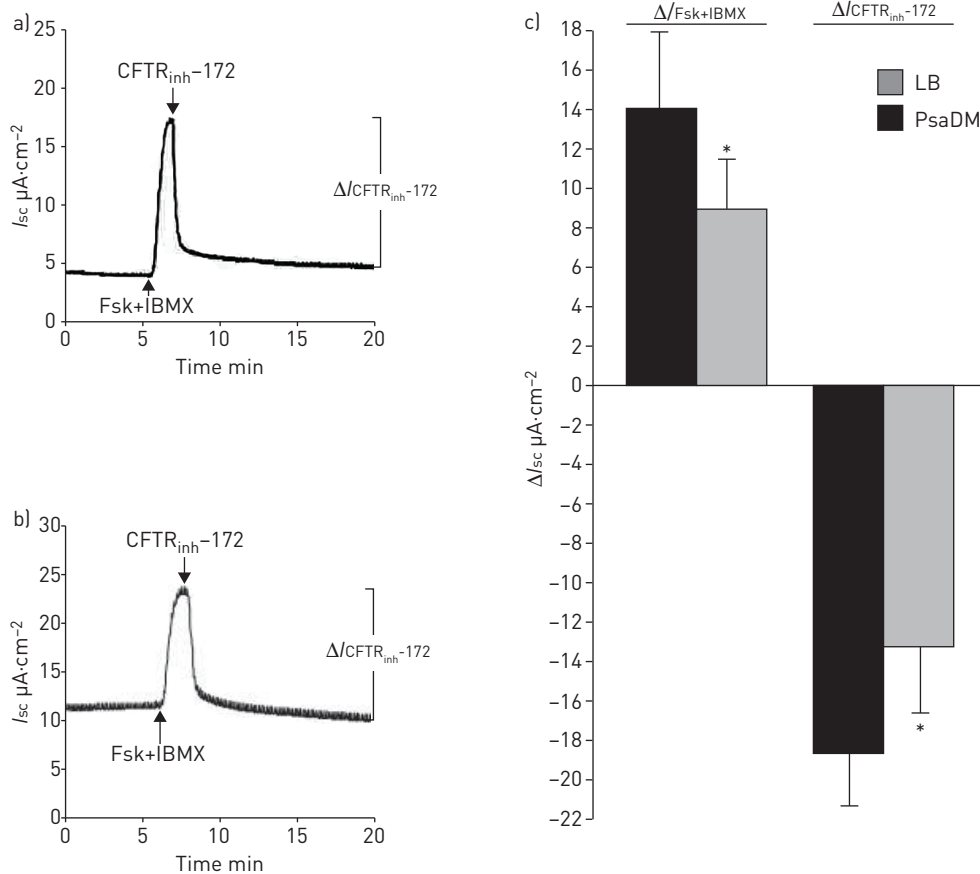


FIGURE 7 Inhibition of wildtype cystic fibrosis transmembrane conductance (wt-CFTR) function after *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment in non-cystic fibrosis (CF) human primary airway cell monolayers. Short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements in an Ussing chamber were performed on non-CF human primary airway cell monolayers, cultured on permeant filters at the air-liquid interface, treated for 24 h with either 5% lysogeny broth (LB) medium or PsaDM. After mounting in an Ussing chamber, cells were bathed with an asymmetrical physiological solution (low chloride ( $Cl^-$ ) physiological solution at the apical side and high  $Cl^-$  solution at the basolateral side), supplemented with 10  $\mu M$  amiloride. Upon  $I_{sc}$  stabilisation, cells were treated with a combination of forskolin (Fsk) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), followed by CFTR<sub>inh</sub>-172. Representative  $I_{sc}$  traces are reported for each condition a) LB and b) PsaDM while quantifications of the mean  $\Delta I_{Fsk+IBMX}$  and  $\Delta I_{CFTR_{inh}-172}$   $I_{sc}$  are reported in c).  $n=7$ ; \*:  $p<0.05$ .

Similar to our results, SWIATECKA-URBAN *et al.* [6] previously reported that a 4–6 h period of incubation with a culture of a *P. aeruginosa* laboratory isolate (PA14) reduced CFTR-mediated transepithelial  $Cl^-$  secretion through Calu-3 cells as well as CFBE41o- cells stably expressing wt-CFTR. Importantly, we now confirmed the deleterious impact of a 24-h exposure to *P. aeruginosa* exoproducts in differentiated primary cultures of non-CF human airway cells (fig. 7). In contrast with these data, it has been shown that acute (15 min) application of *P. aeruginosa* (PA14) or purified LPS increased the rate of iodide efflux, an index of  $Cl^-$  secretion, through 2WT2 epithelial cells expressing wt-CFTR [9]. Furthermore, BUYCK *et al.* [35] have shown that *P. aeruginosa* LPS-stimulated  $Cl^-$  currents through CFTR channels in 16HBE14o- cells, probably *via* a calcium signal. Similarly, N-(3-oxo-dodecanoyl)-S-homoserine lactone (3O-C12), a quorum sensing molecule secreted by *P. aeruginosa*, has been shown to rapidly enhance  $Cl^-$  and fluid secretion as well as cytosolic calcium and cAMP levels [36]. It has also been reported that *P. aeruginosa* flagellin activated CFTR-dependent anion secretion in Calu-3 (through p38 signalling) as well as in primary cultures of human bronchial epithelial cells [37]. Most of these observations were interpreted as an attempt by airway epithelia to rapidly react to bacterial infection by increasing CFTR-dependent ion and fluid flow necessary for bacterial clearance from the airways. Notably, whereas pyocyanine (N-methyl-1-hydroxyphenazine) slightly activated basal  $Cl^-$  secretion through CFBE-wt cells, this redox-active virulence factor produced by *P. aeruginosa*, severely inhibited Fsk-stimulated  $Cl^-$  secretion [38]. Our results, as well as data from the literature, thus indicated that the effects of *P. aeruginosa* infection may be time- and model-dependent. Moreover, different *P. aeruginosa* products/virulence factors present in PsaDM could be responsible for the observed effects, and further studies would be necessary to clearly define their mechanisms of actions.

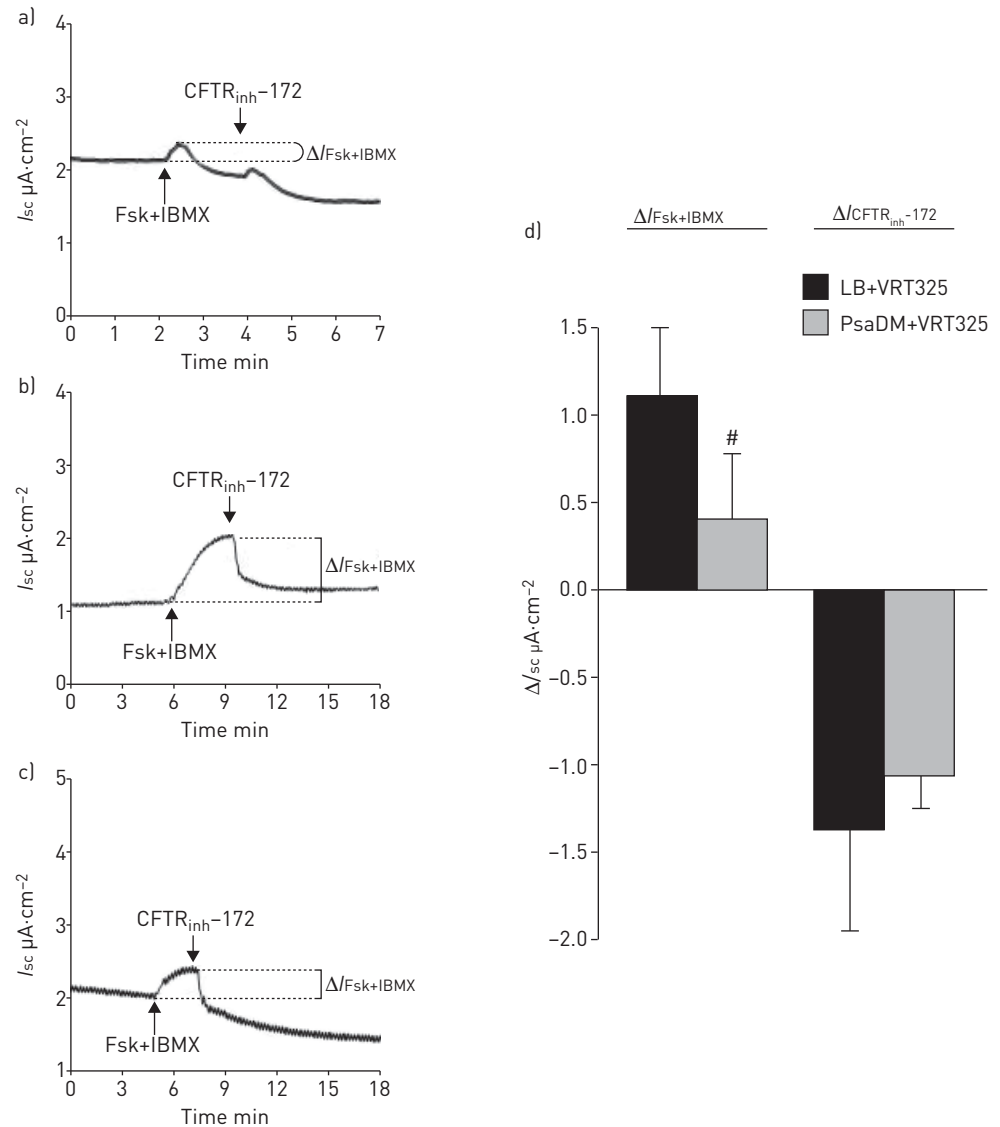


FIGURE 8 Inhibition of  $\Delta F508$  cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ( $\Delta F508$ -CFTR) functional rescue after *Pseudomonas aeruginosa* diffusible material (PsaDM) treatment in cystic fibrosis (CF) human primary airway cell monolayers. Short-circuit current ( $I_{sc}$ ) measurements in an Ussing chamber were performed on CF human primary airway cell monolayers, cultured on permeant filters at the air-liquid interface and treated or not for 24 h with 10  $\mu M$  VRT-325 in combination with either 5% lysogeny broth (LB) medium or PsaDM. After mounting in an Ussing chamber, filters were bathed with an asymmetrical physiological solution (low chloride ion ( $Cl^-$ ) physiological solution at the apical side and high  $Cl^-$  at the basolateral side), supplemented with 10  $\mu M$  amiloride. Upon  $I_{sc}$  stabilisation, the filters were treated with a combination of forskolin (Fsk) and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), followed by CFTR<sub>inh</sub>-172. Representative  $I_{sc}$  traces are reported for each condition a) LB, b) LB+VRT-325, and c) PsaDM+VRT-325, while d) shows quantifications of the mean  $\Delta I_{Fsk+IBMX}$  and  $\Delta I_{CFTR_{inh}-172}$   $I_{sc}$ . n=6; #:  $p < 0.03$ .

#### Impact of infection on CFTR expression

In order to determine if the decrease in CFTR function after chronic exposure to *P. aeruginosa* products could be due to a decrease in CFTR expression, we then undertook PCR and immunoblot measurements to assess changes in CFTR mRNA and protein expression in CFBE-wt cells. Whereas the level of wt-CFTR mRNA was not affected after a 24-h treatment with PsaDM, we observed that both immature (band B) and mature (band C) CFTR proteins were severely reduced in CFBE-wt cells. In contrast with our results, a previous study [6] indicated that live *P. aeruginosa* bacteria (PA14 strain with 4–6 h of infection) had no effect on total cellular expression of wt-CFTR. However, it was shown that PA14 decreased the expression of wt-CFTR at the apical membrane, which is in agreement with the reduced function of CFTR observed under infectious conditions in that study as well as in ours. Moreover, our immunoblot assays after surface biotinylation as well as immunofluorescence analysis with confocal microscopy (fig. 3) showed reduced CFTR membrane expression after PsaDM exposure.

It has to be noted that PACF508 used in our study is a clinical mucoid strain. However, it seems that the mucoid phenotype of *P. aeruginosa* is not responsible for the deleterious effect on CFTR since the non-mucoid laboratory strains PAO1 and PA14 have also been shown to downregulate CFTR [6, 39]. The study by RUBINO *et al.* [39] indicated that a mechanism involving bacterial pilin and flagellin as well as cellular NHERF1 could be involved in CFTR regulation by *P. aeruginosa*. In fact, various products secreted by *P. aeruginosa* have also been shown to have an impact on CFTR expression and function. Pyocyanin, for example, was found to inhibit CFTR expression at the apical membrane of airway epithelial cells [40]. The PA2394 protein (called CFTR inhibitory factor, Cif) secreted by *P. aeruginosa* is also involved in the reduction of CFTR apical membrane expression [41]. A model was then proposed where Cif secretion in *P. aeruginosa* outer membrane vesicles may reduce USP10-mediated deubiquitination of CFTR and secondarily increase the degradation of CFTR in lysosomes [42]. In agreement with CFTR degradation induced by infection, our results observed in the presence of CHX (fig. 4) indicated that the kinetics of wt-CFTR protein degradation could be slightly faster in the presence of PsADM, compared to control conditions. However, this effect may not be sufficient to explain the huge inhibition of CFTR protein expression induced by PsADM as shown in figure 2. In fact, our data obtained in the presence of MG132 and/or CHX (figs 4 and 5) indicated that CFTR synthesis may also be affected by PsADM. Our study, as well as data from the literature, thus indicated that *P. aeruginosa* exoproducts may impact CFTR protein synthesis, degradation and trafficking/recycling to the cell membrane. A reduction in CFTR protein expression and function in non-CF airways exposed to chronic infection, for example in COPD patients, may have a negative impact on mucociliary clearance and consequently on the ability of airways to clear bacteria. This phenomenon could thus create a vicious circle of infection impairing CFTR, this CFTR dysfunction then favours infection.

#### Impaired $\Delta F508$ -CFTR rescue in the presence of infection

Our immunoblot experiments on CFBE- $\Delta F508$  cells first revealed that the immature band B of  $\Delta F508$ -CFTR was decreased by a 24-h exposure to PsADM (fig. 2c–f). Furthermore, immunoblot and Ussing chamber measurements showed for the first time that *P. aeruginosa* exoproducts severely affected the ability of a CFTR corrector to rescue  $\Delta F508$ -CFTR maturation and function in CFBE- $\Delta F508$  cells as well as in CF primary airway epithelial cells (figs 6 and 8). These results are in agreement with a previous study [6] indicating that *P. aeruginosa* PA14 bacteria decreased CFTR currents induced by low temperature rescue in CFBE cells expressing  $\Delta F508$ -CFTR. The mechanisms whereby  $\Delta F508$ -CFTR rescue may be affected by *P. aeruginosa* remain to be elucidated.

Altogether, these data indicate that the presence of infection in CF patients may impair the ability of CFTR correctors to rescue the basic CFTR defect. These observations are critical to future screenings of CFTR correctors that should take into account the infectious component, in order to select small corrector molecules that could be efficient despite the presence of pathogens.

#### Acknowledgements

We acknowledge R.J. Bridges (Rosalind Franklin University, North Chicago, IL, USA) and Cystic Fibrosis Foundation Therapeutic Inc. (CFFT) (Bethesda, MA, USA) for providing VRT-325 as well as J. Riordan (University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) and Cystic Fibrosis Foundation Therapeutic Inc for CFTR Ab596. Primary airway epithelial cells were from our Biobank of respiratory tissues of Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), (Montreal, QC, Canada)/ Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) of the Respiratory Health Network of FRQS. Finally, we acknowledge the logistical assistance from the Research Support Office, CRCHUM.

#### References

- 1 Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* 2003; 445: 495–498.
- 2 Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, *et al.* Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 2012; 487: 109–113.
- 3 Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, *et al.* Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1703–1715.
- 4 Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, *et al.* Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* 2010; 50: 152–157.
- 5 Cohen-Cymbberknoh M, Kerem E, Ferkol T, *et al.* Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax* 2013; 68: 1157–1162.
- 6 Swiatecka-Urban A, Moreau-Marquis S, Maceachran DP, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C862–C872.
- 7 Zahm JM, Delavoie F, Toumi F, *et al.* Long acting  $\beta_2$ -agonist and corticosteroid restore airway glandular cell function altered by bacterial supernatant. *Respir Res* 2010; 11: 6.
- 8 Le Gars M, Descamps D, Roussel D, *et al.* Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator *via* calpains and disables channel function *in vitro* and *in vivo*. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 170–179.

- 9 Haenisch MD, Ciche TA, Luckie DB. *Pseudomonas* or LPS exposure alters CFTR iodide efflux in 2WT2 epithelial cells with time and dose dependence. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 1087–1092.
- 10 Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 486–491.
- 11 Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 841–851.
- 12 Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 35: 135–153.
- 13 Ciofu O, Hansen CR, Hoiby N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2013; 19: 251–258.
- 14 Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 701–726.
- 15 Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, et al. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* 2012; 45: 1132–1144.
- 16 Van Goor F, Straley KS, Cao D, et al. Rescue of  $\Delta F508$ -CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L1117–L1130.
- 17 Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, et al. Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J* 2007; 406: 257–263.
- 18 Rowe SM, Pyle LC, Jurkevante A, et al.  $\Delta F508$  CFTR processing correction and activity in polarized airway and non-airway cell monolayers. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23: 268–278.
- 19 Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect *in vitro* by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 18843–18848.
- 20 Kim Chiaw P, Wellhauser L, Huan LJ, et al. A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR. *Mol Pharmacol* 2010; 78: 411–418.
- 21 Farinha CM, King-Underwood J, Sousa M, et al. Revertants, low temperature, and correctors reveal the mechanism of F508del-CFTR rescue by VX-809 and suggest multiple agents for full correction. *Chem Biol* 2013; 20: 943–955.
- 22 He L, Kota P, Aleksandrov AA, et al. Correctors of  $\Delta F508$  CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *FASEB J* 2013; 27: 536–545.
- 23 Okiyoneda T, Veit G, Dekkers JF, et al. Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function. *Nat Chem Biol* 2013; 9: 444–454.
- 24 Becq F, Mettey Y, Gray MA, et al. Development of substituted Benzo[c]quinolinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem* 1999; 274: 27415–27425.
- 25 Robert R, Carlile GW, Pavel C, et al. Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 478–489.
- 26 Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, et al. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the  $\Delta F508$  CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 522–529.
- 27 Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, et al. Failure of cAMP agonists to activate rescued  $\Delta F508$  CFTR in CFBE41o–airway epithelial monolayers. *J Physiol* 2005; 569: 601–615.
- 28 Trinh NT, Bardou O, Privé A, et al. Improvement of defective cystic fibrosis airway epithelial wound repair after CFTR rescue. *Eur Respir J* 2012; 40: 1390–1400.
- 29 Berube J, Roussel L, Nattagh L, et al. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2010; 285: 22299–22307.
- 30 Maille E, Trinh NT, Privé A, et al. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF- $\alpha$  after injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 301: L945–L955.
- 31 Leroy C, Privé A, Bourret JC, et al. Regulation of ENaC and CFTR expression with K<sup>+</sup> channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L1207–L1219.
- 32 Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y, et al. Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L1027–L1037.
- 33 Trinh NT, Privé A, Maille E, et al. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L866–L880.
- 34 Trinh NT, Privé A, Kheir L, et al. Involvement of K<sub>ATP</sub> and KvLQT1 K<sup>+</sup> channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L870–L882.
- 35 Buyck JM, Verriere V, Benmahdi R, et al. *P. aeruginosa* LPS stimulates calcium signaling and chloride secretion via CFTR in human bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2013; 12: 60–67.
- 36 Schwarzer C, Wong S, Shi J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* homoserine lactone activates store-operated cAMP and cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent Cl<sup>−</sup> secretion by human airway epithelia. *J Biol Chem* 2010; 285: 34850–34863.
- 37 Illek B, Fu Z, Schwarzer C, et al. Flagellin-stimulated Cl<sup>−</sup> secretion and innate immune responses in airway epithelia: role for p38. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L531–L542.
- 38 Schwarzer C, Fischer H, Kim EJ, et al. Oxidative stress caused by pyocyanin impairs CFTR Cl<sup>−</sup> transport in human bronchial epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1653–1662.
- 39 Rubino R, Bezzerri V, Favia M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1. *Pflugers Arch* 2014; 466: 2269–2278.
- 40 Kong F, Young L, Chen Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1121–1133.
- 41 MacEachran DP, Ye S, Bomberger JM, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* 2007; 75: 3902–3912.
- 42 Bomberger JM, Ye S, Maceachran DP, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1001325.